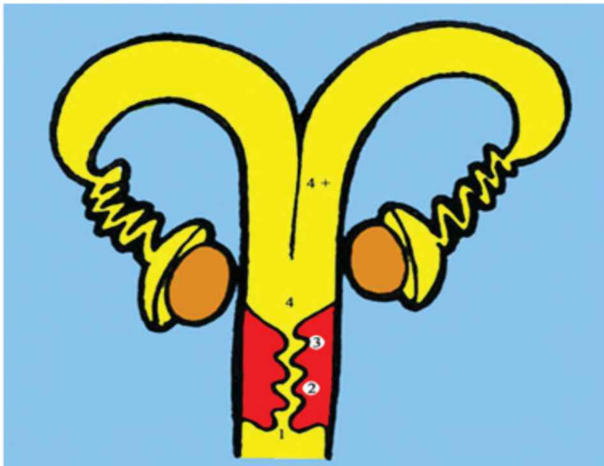


UB Press
UNIVERSITY of BRAWIJAYA PRESS

PEDOMAN INSEMINASI BUATAN PADA TERNAK





Prof. Dr. Ir. Trinil Susilawati, MS

PEDOMAN INSEMINASI BUATAN PADA TERNAK



Pedoman Inseminasi Buatan Pada Ternak

Prof. Dr. Ir. Trinil Susilawati, MS.



2013

Perpustakaan Nasional : Katalog dalam Terbitan (KDT)

Pedoman Inseminasi Buatan pada Ternak

Cetakan Pertama, Juni 2013

Penulis	:	Prof. Dr. Ir. Trinil Susilawati, MS.
Perancang Sampul	:	Pipit Tunjungsari
Penata Letak	:	Lusvita Anggraini
Pracetak dan Produksi	:	Tim UB Press

Penerbit:

Universitas Brawijaya Press (UB Press)



Penerbit Elektronik Pertama dan Terbesar di Indonesia

Jl. Veteran, Malang 65145 Indonesia

Telp: 0341-551611 Psw. 376

Fax: 0341-565420

e-Mail: ubpress@gmail.com

http://www.ubpress.ub.ac.id

ISBN: 978-602-203-458-2

132 hal + xviii, 15.5 cm x 23.5 cm

Prakata

Alhamdulillahirrobil alamin telah selesai buku *Pedoman Inseminasi Buatan pada Ternak* yang diperuntukkan pada petugas Balai Inseminasi Buatan, petugas peternakan di Dinas Peternakan dari tingkat pusat hingga di lapang, inseminator, mahasiswa peternakan, serta para peneliti di perguruan tinggi, balai penelitian dan pengembangan peternakan maupun praktisi pengguna teknologi Inseminasi Buatan.

Inseminasi Buatan (IB) merupakan salah satu teknologi dalam reproduksi ternak yang telah lama diaplikasikan di masyarakat dan berhasil meningkatkan mutu genetik ternak, akan tetapi masih banyak hal-hal di dalam aplikasi IB yang belum dilakukan sehingga berdampak pada kegagalan untuk peningkatan mutu genetik tetapi lebih tragis lagi adalah penyebab terjadinya penurunan populasi ternak yang disebabkan oleh panjangnya jarak beranak.

Di dalam buku ini dituliskan secara rinci tentang hal-hal yang berkaitan dengan Inseminasi Buatan, sehingga peran pengguna bisa mengetahui dan memahami cara-cara meningkatkan keberhasilan Inseminasi Buatan secara utuh, bukannya hanya pada sekedar melakukan inseminasi buatan.

Besar harapan kami buku ini dapat bermanfaat sebagai pedoman di dalam pelaksanaan Inseminasi Buatan dan juga penelitian yang dapat mengembangkan keberhasilan Inseminasi Buatan.

Daftar Isi

Prakata v

Daftar Isi vii

Daftar Tabel ix

Daftar Gambar.. xi

Istilah-Istilah xv

BAB 1
Pendahuluan.. 1

BAB II
Keuntungan dan Kerugian Inseminasi Buatan 3

2.1. Makna Inseminasi Buatan.. 3

2.2. Keuntungan dan kerugian IB... 3

BAB III
Perkandangan dan Pemilihan Pejantan.................................. 5

3.1. Perkandangan... 5

3.2. Pemilihan Pejantan... 9

BAB IV
Penampungan Semen.. 13

4.1. Vagina Buatan.. 13

BAB V
Uji Kualitas Semen 29

5.1. Uji Makroskopis (Volume, Warna dan pH)........................... 31

5.2. Uji Mikroskopis 32

5.3 CASA 58
5.4. Uji Biokimia 68
5.5 Uji Biologis 68

BAB VI
Pengencer dan Sistem Pengenceran Semen 69
6.1. Pengencer semen dan fungsinya 69
6.2. Pengencer semen alternatif. 79

BAB VII
Pendinginan dan Pembekuan Semen 95
7.1. Prinsip-prinsip pembekuan sel (***Cryobiologi***) 96
7.2. Pembekuan semen sapi... 100

BAB VIII
Thawing dan Teknik Inseminasi Buatan 115
8.1. Mekanisme dan beberapa Teknik Thawing 115
8.2.Teknik Inseminasi Buatan 116

BAB IX
Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan Inseminasi Buatan 121
9.1. Kualitas semen 121

BAB X
Rekording dan Evaluasi Keberhasilan Inseminasi Buatan.... 125

Bahan Bacaan 127

Biografi Penulis.. 131

Daftar Tabel

Tabel

4.1. Frekuensi koleksi semen dan persiapan Vagina Buatan (Ax *et al*, 2008)........ 15

5.1. Score berdasarkan gerak masa........ 33

5.2. Faktor-faktor Endogenous yang mempengaruhi motilitas Spermatozoa........ 33

5.3. Faktor-faktor eksogenous yang mempengaruhi motilitas spermatozoa........ 33

5.4 Nomenklatur dari hasil semen analisis........ 41

5.5. Konsentrasi semen domba hubungannya dengan konsistensi........ 42

5. 6. Standar Parameter Motilitas Menggunakan CASA pada Beberapa Hewan........ 62

6.1 Jumlah *straw* yang dihasilkan, penyimpanan dan hasil IB dengan menggunakan semen beku dalam kondisi rata-rata (Hafez, 2008 b)........ 73

6.2. Komposisi Kimia Pengencer Tris Amino Methan dalam 100........ 75

6.3. Tris fruktose kuning telur pengencer untuk domba........ 75

6.4. Komposisi kimia pengencer *trisaminomethan* dalam 1000 ml tanpa *glycerol* 13%........ 81

7.1. Karakteristik biofisika dari beberapa krioprotektan........ 99

7.2. Identifikasi *straw* di BBIB Singosari........ 104

7.3 Identifikasi *straw* di BBIB Lembang........ 105

8.1. Deteksi berahi dan prosedur Inseminasi Buatan (Ax *et al*, 2008)........ 117

Daftar Gambar

Gambar

3.1 Kandang sapi dilengkapi dengan umbaran 9
3.2 Fasilitas agar pejantan bisa berjalan-jalan............................ 9
3.3 Sapi Lokal.. 10
3.4 Japanese black dan Red shorthorn 10
3.5 Hereford dan Simental... 10
3.6 Pejantan Sapi Perah 11
4.1 Penampungan semen dengan menggunakan Vagina Buatan di BIBD Ungaran 14
4.2 Penampungan semen babi menggunakan pantom di BIBD Baturiti Bali... 14
4.3 Penampungan semen dengan menggunakan metode masage dan semen dilakukan penyaringan di BIBD Baturiti Bali. 15
4.4 Persiapan pejantan yang akan dilakukan penampungan semen (Zenichiro dkk, 2002) 17
4.5 Pencucian Frenulum Preputium (Zenichiro dkk, 2002).. 17
4.6 Pembersihan bagian pantat teaser (Zenichiro dkk, 2002)19
4.7 Mempersiapkan Vagina Buatan (Zenichiro dkk, 2002)... 21
4.8 Posisi kolektor saat penampungan semen (Zenichiro dkk, 2012) 23
4.9 Proses pengobatan penis yang luka (Zenichiro dkk, 2002) 24
4.10 Kesesuaian identitas sapi dengan label yang dipasang dalam tabung (Zenichiro dkk, 2002) 24
4.11 Hal-hal yang perlu diperhatikan untuk menjaga kualitas semen ....

(Zenichiro dkk, 2002).. 25
5.1 Pola gerak spermatozoa. (A dan B) spermatozoa dengan gerak progresif (C dan D) Spermatozoa tidak bergerak progresif 35
5.2 Viabilitas spermatozoa (A) Hidup (tidak berwarna) dan (B) Mati (Berwarna) (Susilawati, 2000) 36
5.3 Penghitungan spermatozoa dengan haemositometer (Hafez, 2008)... 38
5.4 Posisi spermatozoa yang dihitung dengan menggunakan haemositometer (Sumber The Royal Australian College of General Praktitionares, 22 sept 2010)... 39
5.5 Penghitungan spermatozoa dengan *chamber makler* (Hafez, 2008)... 40
5.6 Tahapan pengujian konsentrasi semen dengan *spectrofotometer* (Zenichiro dkk, 2002).............................. 41
5.7 Gambar Abnormalitas Spermatozoa (Ax *et al*, 2008)....... 44
5.8 Spermatozoa mengalami kelainan (Ax *et al*, 2008) 45
5.9 Spermatozoa normal dan abnormal pada membrannya menggunakan pewarnaan CTC dan diamati dengan mikroskop epi fluorescent (A) Normal, (B) kerusakan membran (Susilawati, 2000) 47
5.10 Spermatozoa normal dan abnormal pada membrannya (Susilawati, 2000) 48
5.11 Spermatozoa yang melalami kerusakan akrosom Pewarnaan eosin negrosin dengan pembesaran 1000 kali... 48
5.12 Hasil evaluasi integritas sperma dengan menggunakan mikroskop fluoressen. (Gambar dibuat Dr. Duane L. Garner, University of Nevada) 49
5.13 Spermatozoa normal dan abnormal pada membrannya diamati dengan Scanning elektron Microskop (A) Normal, (B,C) kerusakan membran (Susilawati,2000).... 50

5.14 Kerusakan membran spermatozoa, pengamatan menggunakan transmisi electron mikroskop (Susilawati, 2000) 50
5.15 Flowchart preparasi spermatozoa untuk pengamatan mikroskop elektron transmisi (Susilawati, 2000) 51
5.16 Flowchart preparasi spermatozoa untuk pengamatan mikroskop elektron scanning (Susilawati, 2000) 52
5.17 Hasil pengamatan status ekrosom dengan methileen Blue (Pewarnaan akrosom jurnal, file 18 Oktober 2010) . 55
5.18 Spermatozoa Normal dan abnormal pada Integritas membrannya (Susilawati, 2000). Pengamatan dengan teknik Hipo osmotik sweling tes (Host-tes) 56
5.19 Hasil Uji Integritas membran babi (Rahmawati dkk, 2010). Pengamatan dengan teknik Hipo osmotik sweling tes (Host-tes) 57
5.20 Kecepatan dan Gerak Spermatozoa 58
6.1 Pengenceran semen (Zenichiro dkk, 2002) 88
6.2 Pengenceran dengan A2 (Zenichiro dkk, 2002) 89
6.3 Proses equilibrasi (Zenichiro dkk, 2002) 89
6.4 Beberapa tahan uji kualitas semen (Zenichiro dkk, 2002)90
6.5 Proses pre freezing dan freezing (Zenichiro dkk, 2002) . 90
6.6 Uji kualitas post *thawing* motility (Zenichiro dkk, 2002) 91
7.1 Mekanisme masuknya krioprotektan didalam sel. 98
7.2 Prosedur pembekuan semen hasil sexing menggunakan pengencer Tris Aminomethan Kuning Telur 101
7.3 Prosedur pembekuan semen menggunakan pengencer Andromed®. 102
7.4 Macam-macam Container Nitrogen Cair 102
7.5 Macam-macam Canister 103
8.1 Berbagai alat yang digunakan untuk IB pada kambing 118
8.2 Tahapan IB pada kambing 119

8.3 Posisi Deposisi semen pada Babi.. 119
8.4 Posisi Penempatan *Insemination gun* saat inseminasi buatan.. 120
8.5 Posisi IB pada kambing... 120
9.1 Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan IB 122
9.2 Peralatan penyimpanan semen beku dalam Nitrogen Cair.. 122

Istilah-Istilah

1. Inseminasi Buatan (IB) adalah memasukkan mani/semen ke dalam alat kelamin hewan betina sehat dengan menggunakan alat inseminasi agar hewan tersebut menjadi bunting;
2. Birahi adalah suatu kondisi dimana sapi betina siap atau bersedia dikawini oleh pejantan dengan disertai gejala yang khas;
3. Semen adalah mani yang berasal dari pejantan unggul, digunakan untuk inseminasi buatan;
4. Semen beku sapi adalah semen yang berasal dari pejantan sapi terpilih yang diencerkan sesuai prosedur dan dibekukan pada suhu minus 196°Celcius;
5. *Service per Conception* (S/C) adalah jumlah pelayanan inseminasi (*service*) yang dibutuhkan oleh seekor betina sampai terjadinya kebuntingan atau konsepsi;
6. *Conception Rate* (CR) adalah persentase sapi betina yang bunting pada inseminasi pertama, dan disebut *conception rate* atau angka konsepsi;
7. Transfer Embrio yang selanjutnya disebut TE adalah proses kegiatan yang meliputi produksi embrio, pembekuan, penyimpanan, *handling*, *thawing*, memasukkan embrio ke dalam alat kelamin ternak betina dengan teknik tertentu agar ternak itu bunting;
8. Resipien adalah ternak betina yang memenuhi syarat sebagai induk semang penerima embrio sampai dengan melahirkan;
9. Penyerentakan Birahi adalah menciptakan kondisi pada sekelompok ternak betina agar mendapatkan gejala berahi pada waktu yang bersamaan yaitu dengan pemberian preparat hormon;

10. Kelahiran Ganda adalah kelahiran dua anak dalam satu proses kelahiran yang diperoleh dari perlakuan kombinasi Inseminasi Buatan dan Transfer Embrio;
11. Produksi semen beku adalah proses kegiatan yang meliputi kegiatan persiapan, penampungan, evaluasi semen, pengenceran, pembekuan, pengemasan dan pemeriksaan paska pembekuan;
12. Pejantan adalah ternak unggul yang memenuhi syarat teknis, reproduktif maupun kesehatan, telah lulus dari uji performans dan uji zuriat, untuk ditampung semennya dan diproses menjadi semen beku;
13. Akseptor adalah ternak betina produktif yang dimanfaatkan untuk inseminasi buatan;
14. Pelatihan adalah proses belajar untuk meningkatkan pengetahuan dan ketrampilan di bidang inseminasi buatan;
15. Inseminator adalah petugas yang telah dididik dan lulus dalam latihan ketrampilan khusus untuk melakukan inseminasi buatan serta memiliki Surat Izin Melakukan Inseminasi (SIMI);
16. Inseminator Mandiri adalah inseminator yang berasal dari kalangan peternak atau masyarakat (bukan pegawai pemerintah);
17. Surat Ijin Melakukan Inseminator Buatan (SIM-I) adalah bukti sah yang dikeluarkan oleh Dinas Provinsi bahwa pemegang SIM-IB berhak melakukan inseminasi buatan dan berlaku selama 4 (empat) tahun;
18. Surat Ijin untuk Asisten Teknis Reproduksi (SIM-A1) adalah bukti sah yang dikeluarkan oleh Dinas Provinsi bahwa pemegang SIM-A2 berhak melakukan pengelolaan reproduksi selama 4 (empat) tahun;
19. Surat Ijin Melakukan Pemeriksaan Kebuntingan (SIM-A2) adalah bukti sah yang dikeluarkan oleh Dinas Provinsi bahwa pemegang SIM-PKB berhak melakukan pemeriksaan kebuntingan selama 4 (empat) tahun;

20. Surat Ijin Melakukan Selektor (SIM-B) adalah bukti sah yang dikeluarkan oleh Dinas Provinsi bahwa pemegang SIM-B berhak melakukan seleksi terhadap ternak hasil IB selama 4 (empat) tahun;
21. Surat Ijin Melakukan Pengawasan Mutu Semen (SIM-C) adalah bukti sah yang dikeluarkan oleh Dinas Provinsi bahwa pemegang SIM-C berhak melakukan pengawasan mutu semen selama 4 (empat) tahun;
22. Pemeriksa Kebuntingan yang selanjutnya disebut sebagai PKB adalah petugas yang telah dididik dan lulus dalam latihan ketrampilan khusus untuk melakukan pemeriksaan kebuntingan serta memiliki SIM-PKB; Pedoman Optimalisasi Inseminasi Buatan (IB) 4
23. Asisten Teknis Reproduksi yang selanjutnya disebut sebagai ATR adalah petugas yang telah dididik dan lulus dalam latihan ketrampilan dasar manajemen reproduksi untuk melakukan pengelolaan reproduksi;
24. Pengawas Mutu Semen Beku/penanganan semen beku adalah petugas yang telah dididik khusus mengenai tatacara penanganan/pengawasan mutu semen;
25. Selektor adalah petugas yang dididik khusus untuk mencatat, memilih dan menyeleksi ternak hasil inseminasi buatan;
26. Supervisor I adalah petugas yang telah dididik khusus tentang pengelolaan SP-IB (Satuan Pelayanan Inseminasi Buatan) tingkat Provinsi;
27. Supervisor II adalah petugas yang telah dididik khusus tentang pengelolaan SP-IB tingkat Kabupaten/Kota;
28. Koordinator IB adalah penanggung jawab pelaksanaan IB di Provinsi maupun Kabupaten/Kota jika petugas yang telah dididik khusus (Supervisor I dan II) belum ada;
29. Recording System adalah sistem kegiatan yang meliputi identifikasi, pencatatan produktifitas, pencatatan silsilah, pencatatan reproduksi dan pencatatan manajemen.

BAB 1
Pendahuluan

Inseminasi Buatan (IB) adalah suatu bioteknologi reproduksi yang secara luas telah dikenal di dunia yang menggunakan teknologi koleksi semen, prosesing dan menempaikan spermatozoa pada alat reproduksi betina untuk memfertilisasi oosit. Sehingga dapat dikatakan suatu *baypass* penempatan semen tanpa terjadinya perkawinan secara alam. Kekuatan IB adalah sebagai pendorong secara komersial untuk menyebarkan bibit unggul yang mempunyai prestasi genetik yang baik ke peternak/industri peternakan dengan harga yang terjangkau. Sifat-sifat genetik penting tergantung pada spesiesnya misalnya sapi potong pada tingkat produksi otot, produksi susu, kemampuan kerja, dan konformasi tubuh yang benar.

Industri peternakan yang besar sangat tergantung pada penggunaan semen beku, sedangkan untuk spesies domestik atau hewan langka sering digunakan semen segar atau semen cair dingin. Hal ini disebabkan tidak ekonomi dan teknis untuk meluasnya penggunaan semen beku.

Penggunaan semen beku secara nyata menurunkan angka fertilisasi, yang pertama sulit dilakukan penelitian peningkatan teknologi terhadap nilai ekonomi suatu industri peternakan. yang kedua keturunan yang dihasilkan tidak dapat dinilai secara ekonomis mengntungkan dalam industri peternakan. Dengan menggunakan Inseminasi Buatan pada semua spesies mempunyai potensi untuk memajukan sebuah industri, dan harus diikuti oleh pendanaan yang cukup, pedoman yang benar dan dilakukan kontrol agar layak secara komersial dan terjadi peningkatan genetik.

Inseminasi Buatan adalah salah satu bentuk bioteknologi dalam bidang reproduksi ternak yang memungkinkan manusia mengawinkan ternak betina yang dimilikinya tanpa perlu seekor pejantan utuh. Inseminasi buatan sebagai teknologi merupakan suatu rangkaian proses yang terencana dan terprogram karena akan menyangkut kualitas genetik ternak di masa yang akan datang. Pelaksanaan dan penerapan teknologi Inseminasi Buatan di lapang dimulai dengan langkah pemilihan pejantan unggul sehingga akan lahir anak-anak yang kualitasnya lebih baik dari induknya. Selanjutnya dari pejantan tersebut dilakukan pe-nampungan semen, penilaian kelayakan kualitas semen, pengolahan dan pengawetan semen dalam bentuk cair dan beku, serta teknik inseminasi yaitu cara penempatan (inseminasi/ deposisi) ke dalam saluran reproduksi ternak betina.

Penerapan teknologi Inseminasi memerlukan tenaga pelaksana yang berwawasan dan memiliki keterampilan yang memadai. Wawasan pengetahuan dapat diberikan melalui pengajaran secara terprogram dan keterampilan teknis dapat dicapai melalui praktik yang intensif di lapang disertai dengan evaluasi yang ketat.

BAB II
Keuntungan dan Kerugian Inseminasi Buatan

2.1. Makna Inseminasi Buatan

Inseminasi Buatan (IB) adalah salah satu teknologi Reproduksi yang mampu dan telah berhasil untuk meningkatkan perbaikan mutu genetik ternak, sehingga dalam waktu pendek dapat menghasilkan anak dengan kualitas baik dalam jumlah yang besar dengan memanfaatkan pejantan unggul sebanyak-banyaknya, Inseminasi Buatan ini sangat kontras dengan keberhasilan Transfer Embrio di dalam perbaikan mutu genetik. Perbaikan mutu genetik menggunakan IB pada sapi perah dapat digunakan sebagai progeni tes untuk menghasilkan pejantan unggul yang dapat dimanfaatkan menghasilkan spermatozoa salah satunya berdasar pada seleksi ukuran testisnya.

2.2. Keuntungan dan kerugian IB

IB telah terbukti dapat mencegah atau menurunkan penyebaran penyakit yang disebabkan oleh perkawinan alam. IB dapat melindungi dari penyebaran penyakit yang disebabkan oleh kontak fisik (perkawinan) tetapi juga penyebaran patogen lainnya yang disebarkan oleh adanya kontak yang meliputi berbagai mikroorganisme protozoa, virus dan bakteri yang bersifat parasit dan patogen.

Didalam industri IB harus bebas dari patogen dengan berpedoman pada :

1. Pejantan bebas dari penyakit patogen;
2. Menggunakan prosedur yang bersih;
3. Dilakukan *treatment* dengan antibiotik.

Test penyakit yang penting adalah brucellosis, campylobacteriosis, leptospirosis, trichomoniasis, tuberculosis dan virus diare.

Antibiotik segera ditambahkan setelah semen diejakulasikan sebagai perlindungan terhadap beberapa penyakit yang terdapat pada semen sapi. Kombinasi antibiotik adalah gentamicin, penisilin dan streptomisin.

Secara umum IB berfungsi untuk: 1) Perbaikan mutu genetik; 2) Pencegahan penyakit menular; 3) Rekording lebih akurat; 4) Biaya lebih murah; 5) mencegah kecelakaan yang disebabkan oleh pejantan. IB dapat difasilitasi dengan menggunakan sinkronisasi estrus dan dapat dilakukan pengaturan jenis kelamin dengan pemanfaatan pemisahan spermatozoa X dan Y (Ax *et al* 2008, Susilawati, 2000).

Kelemahan dari IB jika tidak dikelola dengan baik adalah : 1) Bila seleksi pejantan salah maka bisa menyebarkan sifat jelek; 2) Membutuhkan keterampilan yang tinggi dari Balai Inseminasi Buatan, Penyimpanan selama transport, Inseminator juga peternaknya; 3) Bisa menghilangkan sifat bangsa lokal dalam waktu yang cepat.

BAB III
Perkandangan dan Pemilihan Pejantan

Sistem pemeliharaan sapi pejantan di Balai Inseminasi Buatan dengan dikandangkan pada waktu siang dan malam. Sapi diumbar/dilepas pada pagi hari untuk dimandikan, potong kuku dan ditampung semennya secara rutin, pada umumnya seminggu dua kali.

3.1. Perkandangan

Secara umum, perkandangan di BBIB Singosari dibagi menjadi tiga lokasi, yaitu lokasi kandang atas dan bawah yang diperuntukkan bagi sapi serta kandang kambing. Jenis kandang yang ada di BBIB Singosari terdapat tiga, yaitu kandang jenis *paddock*, kandang jenis *two row with central alley* (*tail to tail)* dan jenis *one row*. Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari memiliki 18 buah kandang yang terbagi atas empat buah kandang di kandang atas (satu buah kandang berjenis *paddock*, dua kandang berjenis *two row with central alley* (*tail to tail)* dan satu kandang berjenis *one row*) serta sebelas kandang di kandang bawah (satu buah kandang *paddock*, delapan buah kandang jenis *two row with central alley* (*tail to tail)* dan dua kandang berjenis (*one row*) dan tiga buah di kandang kambing. Kandang dengan jenis *two row plan with central alley (tail to tail)* ini, ternak berjajar dua baris saling membelakangi satu sama lain (ekor saling berhadapan) yang dipisah oleh lorong atau jalan selebar 2 meter. Kandang yang memakai sistem *one row plan*, yaitu ternak ditempatkan sejajar dengan kepala menghadap keluar dalam satu baris. Kandang jenis *paddock* merupakan kandang ternak yang memiliki umbaran yang memungkinkan ternak untuk bisa bergerak lebih bebas dibandingkan dengan kandang individu. Tipe perkandangan di

atas yaitu bertujuan memberikan rasa aman dan nyaman pada pekerja dan ternak serta efisiensi waktu dalam membersihkan kandang.

Kandang di BBIB Singosari secara keseluruhan terbuat dari bahan yang kuat seperti batu bata dan besi (pada *kandang paddock*) dengan alas plester semen dan tanah dipadatkan, kecuali pada kandang kambing betina terbuat dari kayu dengan model panggung untuk memudahkan dalam membersihkan (Sugeng, 2003). Posisi kandang di BBIB menghadap ke timur searah dengan sinar matahari, karena posisi ini memberikan keuntungan dalam hal pembersihan dengan densifektan, pembasmi hama penyakit dan pengeringan kandang dari air kencing.

3.1.1. Jenis Atap Kandang

Tipe atap kandang yang digunakan di BBIB Singosari adalah tipe atap semi monitor dengan menggunakan bahan asbes untuk mencegah dari sinar matahari langsung dan tidak mudah menyerap panas. Penggunaan tipe atap semi monitor dinilai cocok, karena memiliki sirkulasi udara yang baik terhadap kandang. Bahan atap yang digunakan BBIB, adalah asbes dan ketinggian atap mencapai 2,5–3,5 m dan memiliki kemiringan 20% (setiap satu meter ketinggian atap bagian belakang menurun 20 cm). Tipe atap semi monitor memiliki dua bidang, satu bidang ditindih dengan bidang yang lain, tetapi diantara dua bidang tersebut terdapat celah atau ventilasi yang berfungsi sebagai sirkulasi udara. Tipe atap ini, selain memberikan sirkulasi udara yang baik, juga mampu menahan angin yang terlalu kencang yang membuat udara di dalam kandang menjadi kurang nyaman bagi ternak.

3.1.2. Konstruksi Lantai Kandang

Konstruksi model lantai yang digunakan di seluruh kandang pemeliharaan sapi di BBIB Singosari ada tiga model lantai yang terbuat dari bahan semen dengan alas karpet (untuk sapi di kandang tunggal dan *double*), pasir dan kerikil (sapi di kandang *paddock*). Kontruksi lantai kandang memiliki kemiringan sekitar

1–2% untuk memudahkan urin dan air mengalir menuju selokan kecil di bagian belakang sapi, sehingga kebersihan lantai dan kandang tetap terjaga serta lantai dapat cepat kering. Selisih antara tinggi lantai depan dengan lantai belakang (dekat selokan) adalah 4 cm lebih rendah ke belakang. Kemiringan lantai berkisar 2–5% yang berarti bahwa tiap satu meter ketinggian lantai bagian belakang menurun sebesar 2–5 cm.

3.1.3. Dinding Kandang

Dinding kandang di BBIB Singosari terbuat dari batu bata. Dinding kandang memiliki fungsi sebagai penahan atau penghambat angin yang masuk ke dalam kandang terlalu kencang serta menahan keluarnya udara panas dari dalam kandang yang dihasilkan tubuh ternak. Selain itu, dinding juga mampu melindungi ternak dari udara dingin di malam hari. Fungsi dinding cukup bermanfaat bagi ternak, dinding kandang dibuat lebih tinggi dari tinggi tubuh ternak yang bertujuan mencegah bercampurnya ternak satu dengan yang lain.

3.1.4. Luas dan Kapasitas Kandang

Luas kandang yang digunakan untuk tiap ekor pejantan di BBIB Singosari untuk konstruksi *two row with central alley (tail to tail)* Sapi FH adalah 9,2055 m^2 per ekor dengan ukuran 3,2 m x 2,8 m. Konstruksi kandang *paddock* untuk kandang dalam adalah 14,663 m^2 per ekor dengan ukuran 4,7 m x 3 m dan untuk umbaran 57 m^2 dengan ukuran 10 m x 5,7 m. Setiap ternak di tiap kandang terdapat satu palungan pakan dan dua palungan minum. Pembersihan palungan dan tempat air minum melalui lubang kecil di beberapa bagian sisi palungan dan tempat minum.

3.1.5. Perlengkapan Kandang

Sarana perlengkapan kandang mutlak harus tersedia untuk mendukung seluruh aktivitas di kandang. Sarana perlengkapan kandang, antara lain adalah sumber air, listrik, palungan, selokan, tempat penampungan kotoran dan peralatan kandang.

- Palungan dan Tempat Minum
  Palungan yang ada di BBIB Singosari terbuat dari batu bata. Ukuran palungan pada kandang sapi FH di BBIB Singosari adalah 190x90 cm dengan kedalaman 50 cm. Ukuran tempat minum adalah 90x90 cm dengan kedalaman 40 cm.
- Selokan
  Selokan digunakan sebagai saluran pembuangan feses cair dan urin yang terletak di belakang bagian tubuh ternak. Ukuran selokan kandang sapi FH di BBIB Singosari adalah lebar 30 cm dan kedalaman 15 cm dan kemiringan 1:2 sebesar 60°.
- Tempat Penampungan Kotoran
  Tempat penampungan kotoran di BBIB Singosari terletak di belakang kandang. Kontruksi menyerupai rumah tanpa dinding untuk menampung kotoran pada masing-masing kandang yang ada di sekitarnya. Pengumpulan kotoran kandang berupa feses dilakukan setiap hari melalui saluran drainase menuju tempat penampungan kotoran yang lebih rendah tempatnya dari kandang.
- Peralatan Kandang
  Peralatan yang tersedia di kandang, antara lain: sapu lidi, sekop, selang air, timba plastik, sikat dan kereta dorong. Semua diperlukan untuk aktivitas harian dalam kandang.
- Sumber Air
  Sumber air yang ada di BBIB Singosari diperoleh dari mata air di Lereng Gunung Arjuna dan sumur bor, sesuai penentuan lokasi peternakan harus dekat dengan sumber mata air, salah satunya didekat Lereng Gunung.

3.1.6.Suhu dan Kelembaban Kandang

Suhu dan kelembaban kandang merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kenyamanan ternak. Suhu yang tinggi dengan kelembaban udara yang tidak mendukung akan menyebabkan ternak mengalami cekaman panas (*stress*) dan berakibat menurunnya produktivitas. Rataan suhu udara berkisar antara 16–22°C, kelembaban di BBIB Singosari berkisar

antara 70–90%, pernyataan sesuai dengan Sudono (2003) bahwa rataan suhu udara kandang yang baik berkisar antara 16–22°C dan kelembaban berkisar antara 70–90%.

3.2. Pemilihan Pejantan

Semua sapi pejantan yang ada di BBIB ada yang berasal dari luar (*Import*) dan lokal. Umumnya pemilihan calon pejantan dilakukan dengan dua uji, yaitu uji performan (*performance test*) dan uji zuriat (*progeny test*). Uji performa didasarkan pada penampilan dari setiap individu, seperti berat badan, panjang badan, tinggi gumba, lingkar dada, libido dan kualitas semen serta kesehatan dan penyakit. Uji zuriat didasarkan pada keturunan dalam pemilihan pejantan yang dilakukan oleh BBIB Singosari dan semua prosedur mengikuti aturan yang ditetapkan oleh Direktorat Jenderal Peternakan.



Gambar 3.1 Kandang sapi dilengkapi dengan umbaran



Gambar 3.2 Fasilitas agar pejantan bisa berjalan-jalan



Gambar 3.3 Sapi Lokal



Gambar 3.4 Japanese black dan Red shorthorn



Gambar 3.5 Hereford dan Simental



Gambar 3.6 Pejantan Sapi Perah

BAB IV
Penampungan Semen

4.1. Vagina Buatan

Pejantan sapi muda pertama kali dapat ditampung pada umur 12 bulan, pejantan domba, kambing dan babi adalah 7 bulan sedangkan pejantan kuda 24 bulan (Ax *et al* , 2008).

Penampungan semen terdapat tiga metode yaitu 1) *Massage* (pemijatan/pengurutan) 2) Vagina Buatan dan 3) Elektro ejakulator. Metode *massage* digunakan pada unggas, babi dan lainnya, vagina buatan digunakan untuk penampungan semen ternak secara rutin sedangkan elektro ejakulator digunakan untuk hewan langka atau ternak yang tidak dapat ditampung menggunakan vagina buatan karena kecelakaan misalnya.

Secara rutin pejantan sapi dapat ditampung setiap hari senin, rabu dan jumat, akan tetapi untuk menghasilkan kualitas yang baik dapat dilakukan seminggu dua kali rata-rata total spermatozoa yang didapatkan adalah 8-16 bilion. Rata-rata per minggu dihasilkan 30 bilion spermatozoa. Ternak jantan dapat dilakukan penampungan dengan menggunakan pemancing ternak betina, sesama jantan maupun pantom. Masing-masing individu mempunyai kesukaan atau kebiasaan sendiri-sendiri. Begitu juga dengan lokasi penampungan dan tempat juga mempengaruhi mau tidaknya pejantan ditampung semennya.

Sebelum penampungan semen, lokasi tempat penampungan dibersihkan dengan disinfektan, ternak dimandikan dan bagian prenulum prepution dibersihkan, hal ini penting sebab apabila terdapat penyakit menular akan ditularkan ke banyak betina, atau bila tercampur dengan semen akan menyebabkan kerusakan semen dengan banyaknya mikroba di dalam semen.



Gambar 4.1 Penampungan semen dengan menggunakan Vagina Buatan di BIBD Ungaran

Sebelum dilakukan penampungan pejantan dilakukan *fals mounting* 3–5 kali yang bertujuan untuk meningkatkan libidonya. Vagina buatan yang telah dipersiapkan sesuai dengan suhu badan dan telah diberi vaselin dibagian ujung karetnya, dengan menggunakan sudut kemiringan 45° dan ujungnya terdapat tabung reaksi yang telah ditutup bahan gelap agar semen yang dihasilkan tidak terkena sinar matahari langsung. Semen yang dihasilkan dilakukan uji kualitas semen, pengenceran dan pembekuan sehingga dapat digunakan untuk IB.





Gambar 4.2 Penampungan semen babi menggunakan pantom di BIBD Baturiti Bali





Gambar 4.3 Penampungan semen dengan menggunakan metode masage dan semen dilakukan penyaringan di BIBD Baturiti Bali.

Tabel 4.1. Frekuensi koleksi semen dan persiapan Vagina Buatan (Ax *et al*, 2008)

Frekuensi koleksi/ penampungan semen	Persiapan Vagina Buatan
SAPI	
Semen ditampung 2-3 kali per minggu	Temperatur vagina buatan lebih penting dari pada tekanan di penis, sehingga suhu air perlu dikontrol. Tekanan perlu dipertahankan hingga selesai, temperatur didalam VB 45°C atau berkisar antara 38 – 55°C
DOMBA DAN KAMBING	
Domba jantan dapat ditampung beberapa kali dalam satu minggu karena mempunyai cadangan di epididimis. Jumlah ejakulasi pada kambing lebih sedikit dari pada domba	Temperatur dan teknik penampungan semen mirip dengan sapi. Domba kurang kuat tetapi ejakulasinya cepat, sehingga dibutuhkan koordinasi antara kolektor dengan domanya.
BABI	

Jumlah spermatozoa yang dikeluarkan banyak, juga karea adanya ketersediaan di epididimis. Tidak direkomendasi untuk ditampung setiap hari, sebaiknya 2-5 hari sekali.	Tekanan adalah yang terpenting saat penampungan, karena tipe penis yang panjang, sehigga saat penampungan cara yang digunakan adalah kolektor menggenggam penisnya, sehingga dalam beberapa menit akan keluar
KUDA	
Sama dengan babi, jumlah spermatozoa yang dikeluarkan banyak dan direkomendasikan 2-3 hari selang penampungannya	Cuci penis dengan air sabun dan cuci lagi dengan air bersih untuk menghilangkan semua kotoran. VB yang digunakan harus lebih besar dari penis yaitu diperkirakan sebesar penis saat ereksi

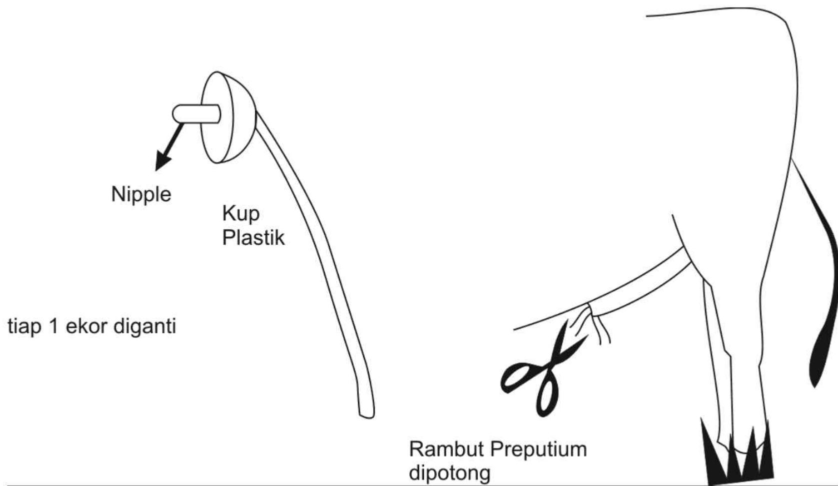
I. Persiapan Pejantan Sebelum Penampungan

A. Pengambilan Pejantan Dari Kandang

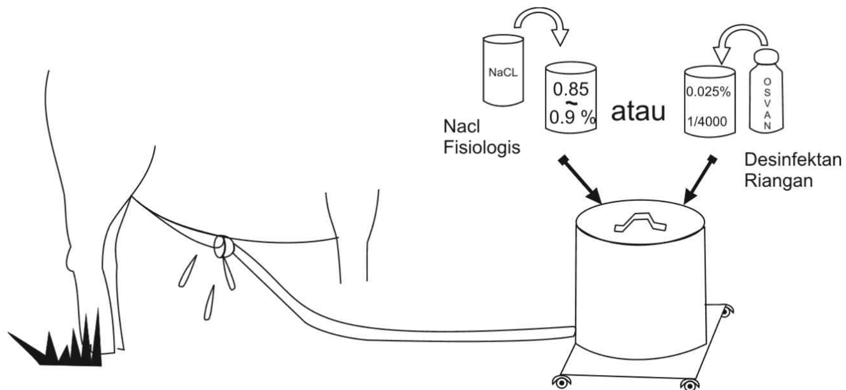
1. Hal–hal yang harus diperhatikan sebelum mengeluarkan pejantan dari kandang antara lain nama sapi, bangsa sapi, warna bulu, motif atau belang pada tubuh sapi, label di telinga sapi (*ear mark*), cap bakar (sesuai jadwal penampungan);
2. Pastikan bahwa pejantan sudah dalam keadaan bersih terutama pada perut bagian bawah dan pantat (sudah dimandikan) dan sudah diberi makan;
3. Keluarkan pejantan dari kandang menuju tempat penampungan;
4. Hal yang juga diperhatikan adalah cara membawa pejantan untuk menjaga keselamatan petugas.

B. Pencucian Preputium

1. Potong rambut preputium menggunakan gunting secara manual/elektrik;
2. Cuci preputium dengan menggunakan larutan NaCl fisiologis 0,85 – 0,9 % larutan disinfektan ringan 1 : 4000, dengan alat Preputium Washing Machine;
3. Ulangi pencucian tiap ekor pejantan sebanyak 2–3 kali;
4. Tiap ekor pejantan menggunakan satu alat pencuci;
5. Setelah pencucian, preputium dikeringkan dengan menggunakan handuk.



Gambar 4.4 Persiapan pejantan yang akan dilakukan penampungan semen (Zenichiro dkk, 2002)



Gambar 4.5 Pencucian Frenulum Preputium (Zenichiro dkk, 2002)

II. Persiapan Tempat Penampungan

A. Pembersihan Tempat Penampungan

1. Bersihkan sampah dan kotoran yang ada di tempat penampungan;
2. Pasang dan atur matras/karpet;
3. Siram lantai di area penampungan dengan air untuk menghilangkan debu

B. Persiapan Pembuatan Larutan Pencuci dan Larutan Desinfektan

1. Siapkan air bersih di dalam ember;
2. Buat larutan air disinfektan ringan dengan perbandingan 1 : 1000;
3. Siapkan handuk atau kain untuk mengeringkan bagian tubuh pejantan.

III. Persiapkan *Teaser (*Pemancing)

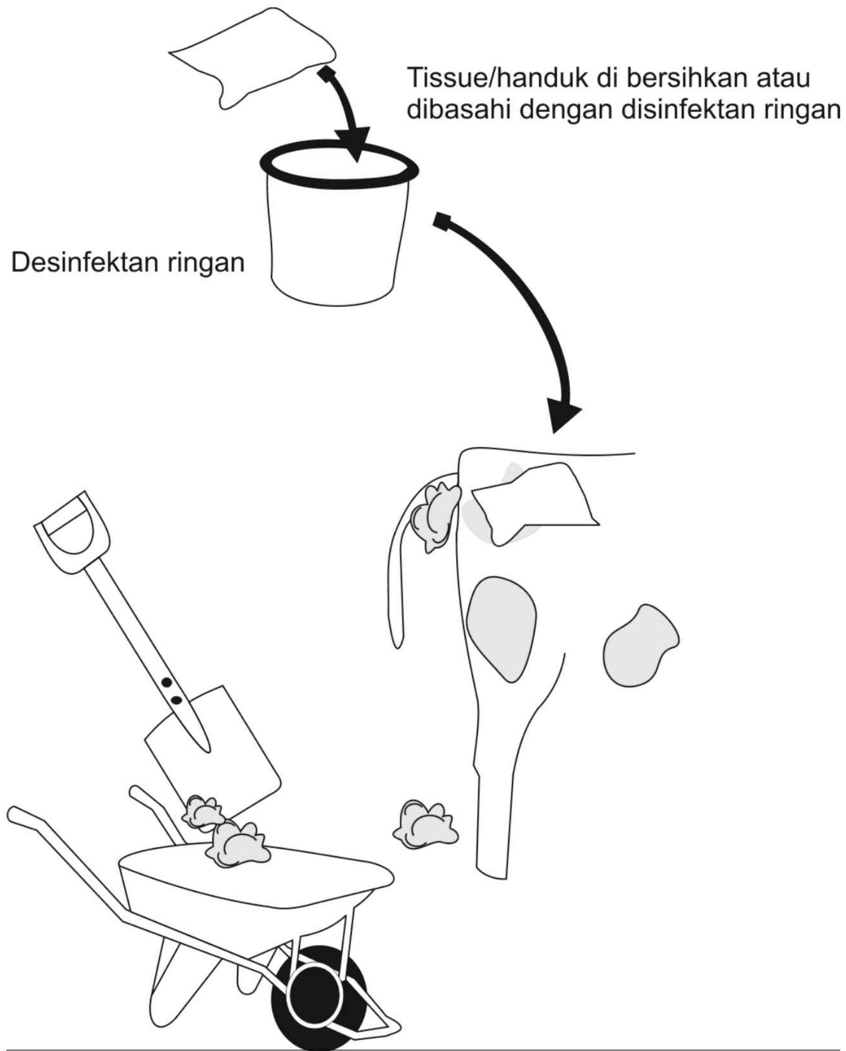
A. *Bull Teaser* (Pejantan pemancing)

Tujuan penggunaan *bull teaser*, mempermudah sapi untuk meningkatkan libido.

1. Karakteristik *bull teaser* : Ukuran tubuh lebih kecil dan tidak aktif.
2. Sapi *teaser* kemudian dimasukkan ke dalam kandang jepit,lalu diikat.

   Cara megikat: Bagian ekor sapi diikat dengan tali, lalu dilewatkan pada perut bagian bawah selanjutnya diikat pada leher *Bull Teaser*:

   - Bersihkan badan *teaser*, terutama pada bagian belakang/ pantat (tempat mounting) dengan menggunakan handuk yang sudah dibasahi dengan larutan disinfektan ringan.
   - Bersihkan bagian pantat *teaser* setiap kali selesai penampungan dan setiap kali selesai membuang kotoran

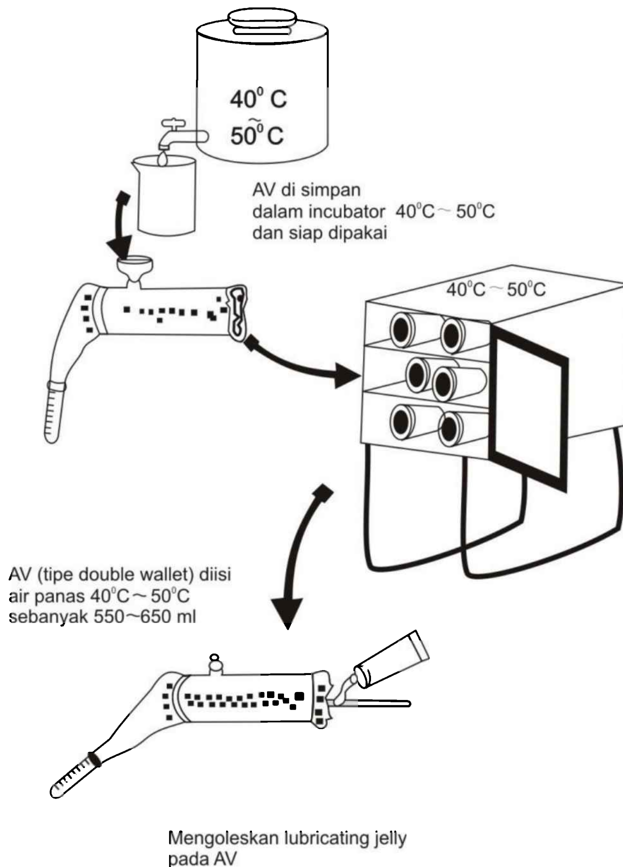


Gambar 4.6 Pembersihan bagian pantat teaser (Zenichiro dkk, 2002)

IV. Persiapan Vagina Buatan (*Double – Waled Type*)

1. Lakukan disinfeksi meja kerja dengan disinfektan ringan 1 : 1000 atau dengan *alcohol* 70%;
2. Persiapan Vagina Buatan
    - Lakukan Vagina buatan (*outer rubber* dan *inner rubber liner*) dan karet cone setelah disterilisasi dalam kondisi yang higienis

- Pasang *Collection tube* 15 ml pada ujung *cone;*
- Masukkan air hangat bersuhu 40–50°C sebanyak 550–650 ml ke dalam vagina buatan;
- Vagina buatan yang telah diisi air hangat bila perlu dipompa untuk disesuaikan dengan ukuran penis;
- Simpan vagina buatan (yang sudah diisi air) di dalam *incubator* bersuhu 45–50°C
- Siapkan vagina buatan sehari sebelum penampungan, sejumlah sama dengan penampungan yang akan dilakukan;
- Olesi vagina buatan sehari sebelum penampungan, sejumlah sama dengan penampungan yang akan dilakukan;
- Olesi vagina buatan dengan *lubricating jelly* dengan menggunakan *glass stick* dimulai bagian luar lubang sampai 1/3 bagian atas dari vagina buatan;
- Bagian luar lubang vagina buatan tidak boleh disentuh oleh tangan atas diletakkan di sembarang tempat karena telah steril.



Gambar 4.7 Mempersiapkan Vagina Buatan (Zenichiro dkk, 2002)

V. Penampungan Semen

4.5.1 Pakaian

1. Gunakan pakaian model *overall* dan ukurannya pas dengan bentuk badan sehingga dapat bekerja dengan lebih nyaman;
2. Gunakan helm dan sepatu pengaman (*safety boots*) agar dapat bekerja dengan lebih aman;
3. Gunakan *glove* pada tangan kiri sampai siku.

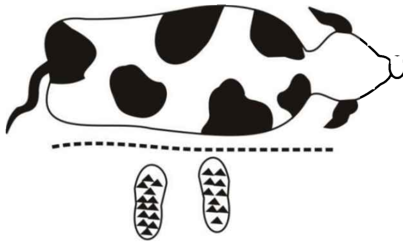
4.5.2 Hal-hal yang harus diperhatikkan pada saat *False Mounting*

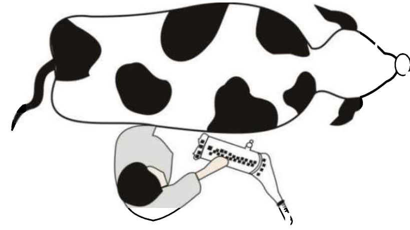
1. Pejantan sebaiknya melakukan *mounting* sebanyak 2–3 kali (kalau terlalu sering pejantan akan mudah lelah dan penis akan mejadi kotor);
2. Pejantan biasanya mengeluarkan cairan kelenjar pelengkap;
3. Penis harus dalam keadaan ereksi (keras dan berwarna merah) dan penis dihindari menyentuh bagian pantat *teaser* (pemancing);
4. Preputium (*Preputium orifice)* tidak boleh dalam keadaan kotor;
5. Penis yang kotor (karena air seni atau tersentuh tangan) harus dilakukan pencucian preputium lagi atau dibersihkan dengan handuk yang sudah diberi disinfektan.

4.5.3 Penampungan Semen Dengan *Bull Teaser* dan *Dummy Cow*

A. Posisi Berdiri kolektor

1. Kolektor siap berdiri di sebelah kanan pejantan atau teaser;
2. Kolektor tidak boleh dalam posisi yang dapat membahayakan dirinya. Misal dapat tertendang atau terinjak pejantan (kaki kiri mundur sedikit sehingga menghasilkan kuda-kuda yang lebih kuat);
3. Untuk mencegah kolektor terjatuh pada saat pejantan ejakulasi, maka bahu kiri kolektor sedikit menempel pada perut pejantan;
4. Setelah ejakulasi, tangan kiri kolektor memegang perut bagian bawah pejantan sehingga dapat menyesuaikan dengan gerakan sapi pada saat penampungan;
5. Lakukan kerjasama antara kolektor dan petugas yang membawa pejantan.





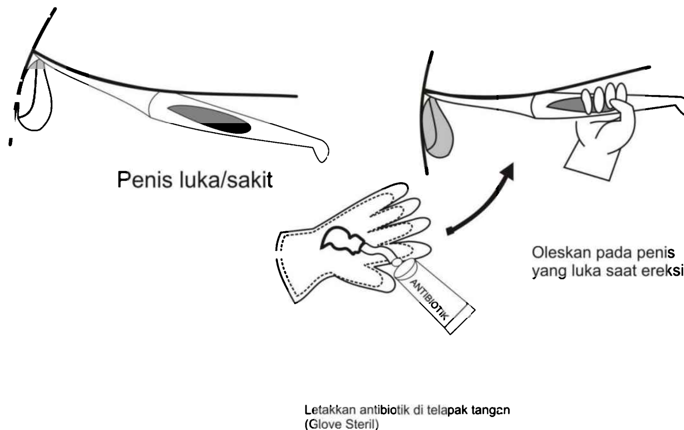
Gambar 4.8 Posisi kolektor saat penampungan semen (Zenichiro dkk, 2012)

B. Pada saat penampungan semen

1. Vagina buatan dibawa dengan tangan kanan dengan sudut kemiringan 35° dengan lubang vagina buatan menghadap ke bawah;
2. Tangan kiri memegang preputium, lalu ditarik perlahan kearah kolektor;
3. Pada saat ereksi, penis diarahkan lalu dimasukkan ke dalam lubang vagina buatan;
4. Pada saat ejakulasi penis bergerak cepat sehingga gerakan vagina buatan juga harus searah dengan gerakan penis;
5. Setelah semen terambil atau setelah ejakulasi, *collection tube* diarahkan ke bawah dan lubang vagina buatan agak ke atas agar semen tidak tumpah.

C. Jika pada saat penampungan semen bercampur dengan darah maka

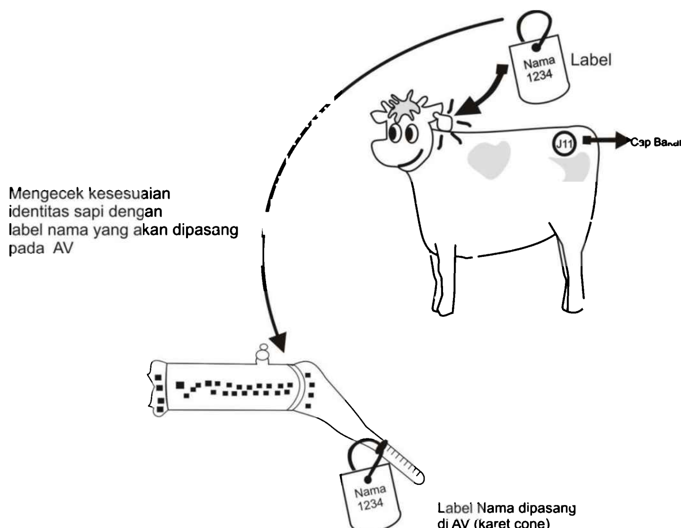
1. Penis harus diperiksa apakah terdapat luka atau bisul pada penis;
2. Penis harus diolesi dengan antibiotik pada saat mengalami ereksi (gunakan *antibiotic* sama seperti digunakan pada penyakit mastitis pada sapi).



Gambar 4.9 Proses pengobatan penis yang luka (Zenichiro dkk, 2002)

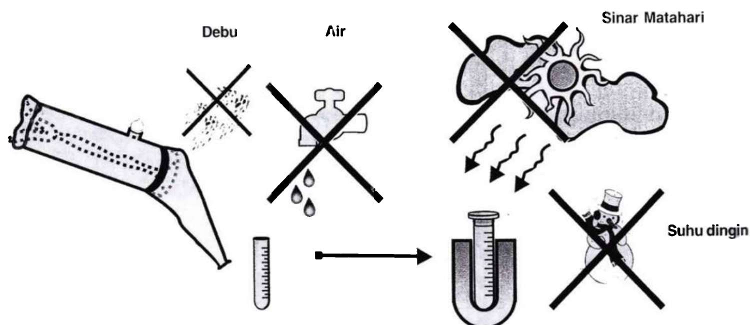
D. Hal – hal yang dilakukan setelah penampungan

1. Pengecekan atau pemeriksaan kembali
   - Identifikasi pejantan yang meliputi nama dan bangsa pejantan, motif pada badan pejantan, label di telinga (*ear mark*), motif/belang,cap bakar, tanda kode;
   - Catat data tentang pejantan (nama, kode, dan data *pre–collection*).



Gambar 4.10 Kesesuaian identitas sapi dengan label yang dipasang dalam tabung (Zenichiro dkk, 2002)

2. Persiapan untuk penampungan selanjutnya
   - Bila satu pejantan sebanyak dua kali, maka antara penampungan yang satu dengan yang kedua diberi jarak 15 menit dan pejantan diistirahatkan di ruang tunggu;
   - Bersihkan bagian belakang pemancing (*teaser*) dan *Dummy Cow* dengan handuk yang sudah dibasahi dengan larutan disinfektan.
3. Melepaskan Karet *Cone* dan *Collection Tube* dari Vagina Buatan
   - Lepaskan karet *cone* dari vagina buatan;
   - Beri label pada *collection tube* dan cocokkan dengan identitas pejantan;
   - Hindari masukkan air dan kotoran ke dalam *collection tube.*
4. Mengirimkan Semen ke Laboratorium
   - Semen tidak boleh mengalami temperature *shock* (perbedaan suhu antara semen dengan lingkungan) dan terkena sinar matahari, karena *collection tube* harus diberi selongsong berwarna hitam;
   - Jika tempat penampungan dan laboratorium jauh, maka selama perjalanan *collection tube* harus diberi pelindung yang berupa kain hitam;
   - Segera kirimkan semen yang sudah ditampung ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan.



Gambar 4.11 Hal-hal yang perlu diperhatikan untuk menjaga kualitas semen (Zenichiro dkk, 2002)

E. Sterilisasi Kering

Digunakan pada peralatan yang terbuat dari logam atau gelas,misalnya : tabung reaksi, tabung *Erlenmeyer*, *collection tube*, tabung ukur, *glass filter, spuit*, jarum *spuit*, batang pengaduk kaca, pipet jarum atau *nozzle* untuk *filling* & *sealing*.

1. Cuci alat dengan air bersih;
2. Gosok dengan sikat dan air sabun;
3. Bilas kembali dengan air bersih;
4. Tiriskan;
5. Bagian lubang/mulut pada alat yang berbentuk tabung ditutup menggunakan alumunium foil, sedangkan untuk alat-alat yang kecil (jarum *spuitmnozzle filling & sealing*),kertas serta kain dibungkus dengan alumunium foil 9 jangan ditutup/dibungkus terlalu rapat);
6. Lakukan sterilisasi dengan memasukkan alat-alat tadi ke dalam oven, panaskan pada suhu 160 -180°C selama 1–2 jam;
7. Setelah sterilisasi selesai, selama pendinginan, pintu oven tidak boleh dibuka (perbedaan suhu antara di dalam oven dengan di luar oven yang tinggi dapat menyebabkan pecahnya alat-alat yang terbuat dari kaca, dan bahan kertas dan kain dapat terbakar);
8. Penyimpanan alat yang sudah disterilkan, bungkus rapat dengan alumunium foil dan simpan dalam lemari alat steril.

F. Disinfeksi dengan perebusan

Digunakan untuk peralatan yang terbuat dari karet, misalnya: tutup tabung reaksi, *silicon tube*, (*flexible rubber*), *inner ruber liner*, karet cone.

1. Cuci alat dengan air bersih;
2. Gosok dengan sikat dan air sabun;
3. Bilas kembali dengan air bersih;
4. Lakukan disinfeksi dengan merebus alat selama 15–30 menit. Selama perebusan, seluruh bagian alat harus terendam di dalam air, tempat merebus harus dalam keadaan tertutup dan jangan memasukkan alat-alat yang terbuat dari kaca saat air mendidih;
5. Tiriskan alat dan keringkan di dalam *heater* (pemanas) listrik;
6. Simpan alat yang sudah didisinfeksi di dalam lemari.

G. Pasteurisasi bersuhu rendah dengan menggunakan oven / inkubator

Digunakan untuk *artificial vagina*, serta peralatan yang terbuat dari karet dan *silicon*.

1. Cuci alat dengan air bersih;
2. Gosok dengan menggunakan sikat dan air sabun;
3. Bilas dengan air bersih;
4. Rebus peralatan;
5. Lakukan pasteurisasi di dalam oven atau *incubator* pada suhu 56–60°C selama 3–12 jam;
6. Penyimpanan dapat dilakukan di dalam oven atau *incubator*.

H. Sterilisasi dengan menggunakan sinar ultra violet (UV)

Digunakan pada alat yang terbuat dari plastik dan kain, misalnya: *straw*, sarung tangan kain, *micropippet tip*.

1. Pastikan posisi alat sehingga seluruh bagian alat terkena sinar UV;
2. Alat-alat yang terbuat dari silikon dan karet tidak perlu disterilisasi dalam waktu yang lama (bila terlalu lama dapat merusak peralatan);
3. Sinar UV dapat merusak mata dan kulit. Oleh karena itu, hindari kontak langsung dengan sinar UV.

Hal-hal penting yang harus diperhatikan di dalam produksi semen beku

1. Sanitasi dan kebersihan lingkungan

- Spermatozoa tidak dapat dilihat dengan mata karena bersifat mikroskopis;
- Setiap saat laboratorium harus dalam keaadaan bersih;
- Pekerjaan di dalam laboratorium harus menggunakan jas lab dan sandal bersih;
- Pekerja di dalam laboratorium harus menggunakan jas lab dan sandal bersih;
- Tangan harus selalu dicuci setiap melaksanakan aktivititas laboratorium.

2. **Pencucian dan disinfeksi seluruh peralatan**
   - Sisa disinfeksi yang tinggi dalam peralatan akan menyebabkan menurunnya persentase kebuntingan dan menimbulkan gangguan reproduksi;
   - Pencucian dan disinfeksi yang dikerjakan secara manual harus benar-benar bersih;
   - Jangan memegang peralatan dengan tangan kotor dan atau tangan yang basah.

3. **Manejemen temperatur untuk menangani semen**
   - Sperma sangat peka terhadap perubahan suhu;
   - Hindari perubahan *temperature drastic* dan *cold shock;*
   - Dalam menangani LN2 terutama saat pemindahan semen beku antara container harus hati-hati.

4. **Banyaknya jenis *bull* dan semen yang ditampung**
   - Warna atau bentuk semua semen adalah sama, sebab semen tiap *bull* bentuknya sama;
   - Hindari pengambilan semen dari *bull* yang berbeda atau dari *bull* selain yang terencana;
   - Khususnya untuk menghindari tercampurnya semen saat pengenceran.

5. **Hasil yang diperoleh apabila kualitas kontrol dipenuhi**
   - *Straw* semen beku akan bagus;
   - Hasil produk seragam;
   - Kualitas semen dalam *straw* sangat baik;
   - *Straw* berisi sperma berkualitas (viabilitas dan vitalitas)
   - Spermanya higienis;
   - Tidak ada masalah dalam penampilan *straw* (print, kerusakan, *seal* dll).

BAB V
Uji Kualitas Semen

Metode standar untuk evaluasi fertilitas pejantan adalah kemampuan membuntingi yang dapat diprediksikan dengan memastikan kualitas semennya.

Ax *et al* (2008) menyatakan tidak ada satu uji kualitas pun yang dapat memprediksi fertilitas secara akurat. Pedoman berdasar pada persatuan *theriogenology* minimal dari karakteristik kualitas semen pada pejantan yang dipergunakan untuk breeding pada sapi dengan klasifikasi:

1. Jumlah spermatozoa lebih dari 500 juta/ml;
2. Lebih dari 50% bergerak *progressif*;
3. Lebih dari 80% mempunyai morfologi normal.

Ternak dinyatakan steril kalau tidak ada spermatozoa yang motil.

Analisa diagnostik yang menunjukkan fungsi testis dan epididimis yang diperiksa beberapa kali dan minimum disebut fertil apabila sampel semennya:

1. Motilitas tidak kurang dari 65%;
2. Kurang dari 20% morfologi spermatozoa abnormal;
3. Tidak kurang 100 juta spermatozoa per mililiter dengan 60-75 mililiter per ejakulasi.

Ax *et al* (2008) menyatakan bahwa semen hasil ejakulasi pada babi terdapat beberapa fraksi yaitu cairan pada fraksi I adalah tidak mengandung spermatozoa (*pre spermatic fraction*), fraksi II adalah bagian yang kaya spermatozoa (*sperm rich fraction*) dan fraksi III adalah sedikit spermatozoa (*post fraction fraction*). Bagian *post spermatic fraction* mengandung plasma semen yang berasal dari kelenjar asesori yang nantinya akan menstimulasi spermatozoa untuk fertilisasi.

Total volume semen babi rata-rata 240–250 ml, 20% merupakan larutan yang mengandung gelatin, 20–30% mengandung spermatozoa dan terdapat perbedaan antara *pre-sperm* dan *post-sperm*. Total volume dan konsentrasi dipengaruhi oleh umur, lingkungan, status kesehatan, prosedur koleksi semen, musim, jumlah penampungan dan bangsa yang berbeda.

Kualitas dan kuantitas semen kuda dapat segera diamati setelah penampungan semen, gel dapat segera dipisahkan dengan bagian yang tidak mengandung gel dengan menggunakan siring jika tidak ada filter di dalam vagina buatan. Filtrasi ini juga perlu untuk menghilangkan debris-debris, rambut dan debu. Volume dari semen yang mengandung gel tidak dapat dilihat melalui warna dan konsistensinya. Volume semen tidaklah penting di dalam fertilisasi akan tetapi total spermatozoa per ejakulasi yang menentukan keberhasilan fertilisasi.

Semen domba berwarna putih susu atau krem muda. Warna merah muda mengindikasikan terjadinya perdarahan pada penis saat penampungan, sedangkan terdapatnya warna abu-abu atau kecoklatan mengindikasikan terdapatnya infersi pada saluran reproduksi jantan dan dengan mencium baunya dapat mendukung diagnosa. Volume yang diejakulasikan dipengaruhi umur pejantan, kondisi fisik, musim, keterampilan, kolektor dan frekuensi penampungan. Jika penampungan dengan menggunakan vagina buatan dibutuhkan *fals mounting* untuk meningkatkan volume dan jika sering dilakukan penampungan yaitu lebih dari 3 kali seminggu maka volume akan menurun. Volume semen domba dewasa berkisar antara 0,5–2 ml, sedangkan yang masih muda berkisar antara 0,5–0,7 ml.

Semen kambing berwarna abu-abu hingga kekuningan dan diantara pejantan warna bervariasi juga pada pejantan yang sama. Volume ejakulasi rata-rata 1 ml dengan range antara 0,5–1,2 ml.

Uji kualitas semen dilakukan segera setelah penampungan atau sebelum diencerkan yang meliputi pemeriksaan makroskopis : volume, warna, konsistensi, pH dan pemeriksaan secara mikroskopis meliputi : motilitas massa, motilitas individu, persentase hidup-mati, konsentrasi dan abnormalitas.

5.1. Uji Makroskopis (Volume, Warna dan pH)

Volume semen sapi bervariasi setiap penampungan antara 1–15 mililiter atau 5–8 mililiter (Lindsay *et al*, 1982 dan Garner and Hafez, 2008). Dengan melihat pada skala tabung yang digunakan untuk menampung semen, maka dapat ditentukan volume semen yang diejakulasikan.

Pada umumnya semen sapi berwarna putih kekuning-kuningan atau hampir seputih susu, hal ini karena adanya riboflavin di dalam semen. Warna tersebut sering dikacaukan apabila tercampur urine, oleh sebab itu bau dapat membedakannya.

Derajat kekeruhannya tergantung pada konsentrasi sel spermatozoa. Semakin keruh biasanya jumlah spermatozoa per milliliter semen semakin banyak . pH semen sapi berkisar antara 6,4–7,8. Pada hewan muda volume lebih sedikit (Ax *et al*, 2008).

Teknik pemeriksaan makroskopis adalah

1. Volume : volume semen yang sudah ditampung pada 1 kali penampungan diukur dengan melihat langsung pada tabung berskala.
2. pH : diukur dengan cara mengambil sedikit semen segar dengan menggunakan ose dan diletakkan pada kertas lakmus atau pH meter kemudian dilihat pH-nya pH semen diuji dengan menggunakan pH BTB paper, pH normal semen = 6,2–6,8.
3. Warna : dilihat pada tabung penampung (abnormal = mengandung air, darah, rambut preputium, nanah air kotor dan bau yang tidak normal). Semen normal berwarna putih kekuningan atau putih susu.

4. Konsistensi : konsistensi berkorelasi dengan konsentrasi spermatozoa. Penilaiannya bisa encer (< 1000.10^6 spermatozoa/ml semen), sedang (1000.10^6-1500.10^6 spermatozoa/ ml semen), dan pekat (>1500.10^6 spermatozoa/ ml semen).

5.2. Uji Mikroskopis

Uji mikroskopis adalah uji kualitas semen yang menggunakan mikroskop. Uji mikroskopis ini terdiri dari : uji motilitas massa, motilitas individu, konsentasi dengan metode thoma, viabilitas (persentase hidup), uji morfologi (abnormalitas spermatozoa).

Parameter motilitas adalah sebagai berikut:

1. Persentase spermatozoa yang motil dalam keadaan normal adalah 70–90 motil;
2. Persentase spermatozoa yang bergerak progresif;
3. Kecepatan spermatozoa (*velocity*) dengan dasar skala 1–2 (cepat);
4. Umur spermatozoa (*longevity*) semen segar dengan suhu ruang (20–25^{0}C), sedangkan semen yang diencerkan dapat menggunakan suhu ruang atau refrigrator 4–6°C.

1. <u>Uji Motilitas Massa</u>

Penilaian motilitas spermatozoa dilakukan setelah semen diencerkan atau setelah *freezing* dan *thawing*. Motilitas massa diamati dengan menggunakan mikroskop tanpa *cover glass* dengan pebesaran 400 kali atau 100 kali pada suhu yang dijaga konstan 37°C.

Kriteria penilaian gerak massa spermatozoa antara lain:

1. Sangat baik (+++) terlihat adanya gelombang besar, banyak, gelap, tebal, dan aktif seperti gumpalan awan hitam dekat waktu hujan yang bergerak cepat berpindah-pindah tempat;
2. Baik (++) bila terdapat gelombang-gelombang kecil tipis, jarang, kurang jelas dan bergerak lamban;
3. Kurang baik (+), jika tidak terlihat gelombang melainkan gerakan-gerakan individual aktif progresif;
4. Buruk (0), bila hanya sedikit ada gerakan-gerakan individual.

Ax *et al* (2008) penentuan berdasarkan gerak gelombang adalah sebagai berikut:

Tabel 5.1. Score berdasarkan gerak masa

Score	Gelombang
0	Tidak ada yang bergerak
1	Bergerak individual
2	Pergerakan sangat pelan
3	Secara umum bergerak dengan amplitudo yang pelan
4	Gerak gelombang cepat dan tidak ada pusaran
5	Gerak gelombang cepat dan terdapat pusaran

Tabel 5.2. Faktor-faktor Endogenous yang mempengaruhi motilitas Spermatozoa

1	Umur	Penyimpanan dalam epididimis
		Umur donor
		Waktu antara setelah ejakulasi
2	Pematangan Sperma	Morfologi
		Fisiologi
		Biokimia
3	Penyimpanan energi (ATP)	Transport membran
		Transport ion
		Pergerakan flagela
		Contractile protein
4	Bahan aktif di permukaan Spermatozoa	Faktor aglutimasi
		Antibody
		Detergents
		Integritas membrane
		Reseptor

Tabel 5.3. Faktor-faktor eksogenous yang mempengaruhi motilitas spermatozoa

1	Faktor biofisika dan fisiologi	Hydrodynamics
		Viscositas
		Osmolaritas
		pH
		Temperature
		Komposisi ion

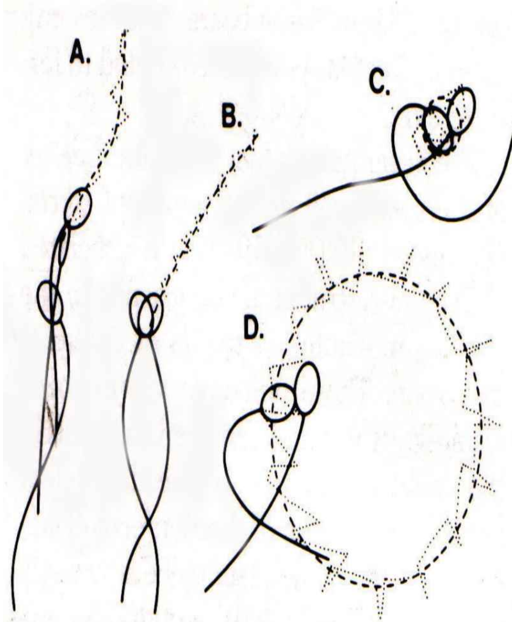
2	Media cairan pendukung	Cairan epididimus Seminal plasma
		Lengkungan vagina
		Lendir servix
		Cairan uterus
		Cairan oviduk
		Bagian perivitelum
3	Stimulasi-penghambat	Ion in organic (Cu, Zn, Cd, Mn, Hg)
		Produk sekretory
		Neuro-phormacolgicals
		Hormone
		Cyclic nucleotides
		Kinins
		Prostaglandins
		Polusi lingkungan
		Faktor imuno kimia

2. <u>Motilitas Individu</u>

Perhitungan motilitas spermatozoa lebih bersifat subyektif dibandingkan dengan viabilitas, oleh sebab itu untuk mengeliminasi subyektivitas pengamat, maka perlu dilakukan pelatihan atau diuji lebih dari satu orang. Evaluasi semen dapat dilakukan pada semen segar atau semen yang telah diencerkan (Ax *et al*, 2008). Evaluasi motilitas semen segar ini juga penting untuk mengamati fungsi kelenjar asesoris di dalam menghasilkan seminal plasma. Pada semen segar dengan konsentrasi yang tinggi sulit untuk diamati sehingga perlu diencerkan.

Gerak individu spermatozoa dapat diamati dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali pada suhu yang dijaga konstan 37°C dengan menggunakan *cover glass*, kemudian menentukan proporsi (persentase) spermatozoa yang bergerak progresif. Toelihere (1993) mengklasifikasikan gerak individu spermatozoa mulai dari pergerakan progresif atau gerak maju yang merupakan gerak terbaik, gerak mundur dan gerak melingkar sering merupakan tanda-tanda *cold shock*, gerakan berayun atau berputar–putar di tempat sering terlihat

pada semen yang tua, kemudian apabila spermatozoa banyak yang berhenti bergerak dianggap mati. Gerakan maju yang kuat pada spermatozoa merupakan indeks daya hidup yang penting dalam populasi spermatozoa.



Gambar 5.1 Pola gerak spermatozoa. (A dan B) spermatozoa dengan gerak progresif (C dan D) Spermatozoa tidak bergerak progresif

Beberapa prosedur yang dikembangkan agar pengujian motilitas tidak bias atau tidak subyektif adalah dengan *time-lapse photograph, frame by frame playback video micrography,spectrophotometer* dan *computerized analisis*.

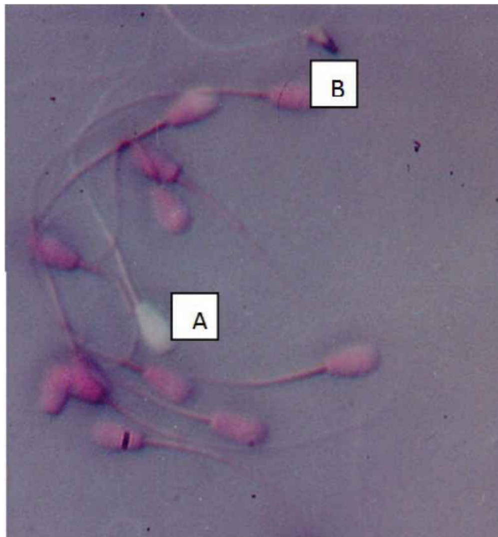
3. Persentase Hidup Mati (Viabilitas)

Spermatozoa yang hidup dan mati dapat dibedakan reaksinya terhadap warna tertentu, sel spermatozoa yang tidak motil dan dianggap mati menghisap warna dan sel spermatozoa yang motil dan yang hidup tidak berwarna. Bahan pewarna yang biasa digunakan adalah eosin negrosin. Eosin dan negrosin adalah pewarna sel yang paling baik dipergunakan, untuk prosedur

ini sehingga pengamatan sel spermatozoa yang berwarna dan tidak berwarna menjadi jelas dan spermatozoa yang berwarna sebagian juga dianggap mati.

Teknik penghitungan persentase hidup spermatozoa dilakukan dengan menggunakan pewarna yaitu eosin-negrosin. Adapun cara kerjanya adalah sebagai berikut:

- Satu tetes semen segar diteteskan pada ujung *object glass* dengan menggunakan ose. Larutan eosin-negrosin diteteskan satu tetes di dekat semen segar, kemudian keduanya dicampur. Campuran tersebut kemudian ditutup dengan *object glass* lain pada ujungnya yang membentuk sudut 45°C dan ditarik ke arah ujung yang lain;
- Hasil olesan diamati pada mikroskop dengan perbesaran 400 kali, spermatozoa yang menyerap warna berarti spermatozoa tersebut mati sedangkan yang tidak menyerap warna berarti hidup.



Gambar 5.2 Viabilitas spermatozoa (A) Hidup (tidak berwarna) dan (B) Mati (Berwarna) (Susilawati, 2000)

Spermatozoa yang hidup membrannya masih baik, sehingga pewarna tidak dapat masuk, sedangkan spermatozoa yang mati adalah membrannya tidak berfungsi, sehingga pewarna dapat masuk ke dalam membran spermatozoa.

4. Konsentrasi Spermatozoa

Konsentrasi semen sapi bervariasi dari 1000–1800 juta spermatozoa tiap milliliter atau 800–2000 juta spermatozoa tiap milliliter (Garner and Hafez ,2008). Bearden dan Fuquay (1984) membedakan konsentrasi antara sapi perah dan sapi potong, yaitu 1200 juta spermatozoa tiap milliliter untuk sapi perah dan 1000 juta spermatozoa tiap milliliter pada sapi potong. Penilaian konsentrasi spermatozoa tiap milliliter semen sangat penting, karena faktor ini dipakai sebagai kriteria penentu kualitas semen dan menentukan tingkat pengencerannya. Konsentrasi semen dapat dihitung dengan menggunakan *haemositometer*, *colorimeter* atau *spectrophotomete*r.

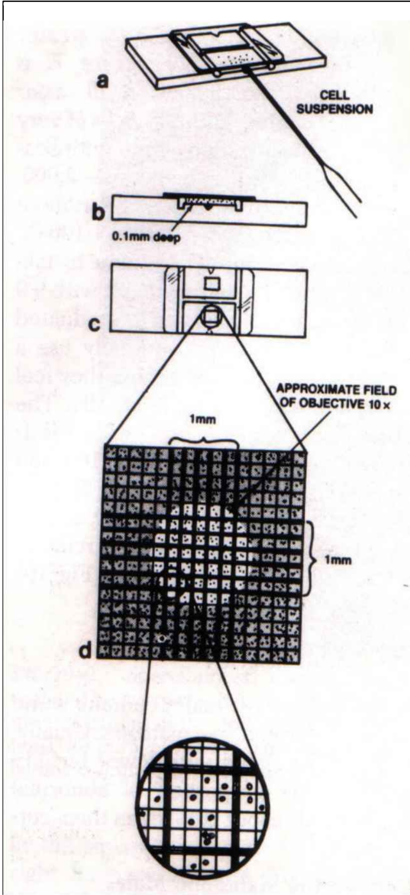
Teknik penghitungan spermatozoa adalah konsentrasi spermatozoa dihitung menggunakan *haemocytometer* dengan cara kerja sebagai berikut: semen dihisap dengan pipet *eritrocyt* sampai angka 0,5 kemudian NaCl 3% dihisap sampai angka 10,1. Pipet eritrocyt digoyang-goyang tetes yang selanjutnya digoyang lagi selama 2–3 menit lagi. Setelah itu semen membentuk angka delapan selama 2–3 menit. Kemudian semen dibuang 1–2 dibuang 1–2 tetes lagi, yang kemudian baru dituang pada kamar hitung yang diatasnya sudah ditutupi dengan *cover glass* sebanyak satu tetes. Spermatozoa dihitung pada 5 kotak (kamar hitung) yaitu pada sudut kanan dan kiri atas, sudut kanan dan kiri bawah, dan tengah.

Seperti gambar 6.2, perhitungan menggunakan hemocytometer dalam menghitung spermatozoa yang ada di dalam *slide* dengan jumlah skor yang pasti di setiap kamarnya, jumlah spermatozoa dalam kotak dihitung secara manual. Saat ini metode ini digantikan dengan spektrophotometer atau *colorimeter* yang telah dikalibrasi dari perhitungan menggunakan haemositometer. Spektrophotometer ini dapat menggantikan penentuan konsentrasi spermatozoa dengan mesin di kalibrasi pada 550 nm. Larutan yang digunakan pada semen adalah sodium sitrat 2,9% dan 5 ml pada 10% formalin/liter. Kurva standar untuk menghitung konsentrasi dibandingkan dengan

pengencer 0,5% dengan cahaya transmeter yang merupakan *range* untuk mengukur konsentrasi, akan tetapi fotometer tidak akurat digunakan pada semen yang terkontaminasi sehingga hasilnya tidak benar.

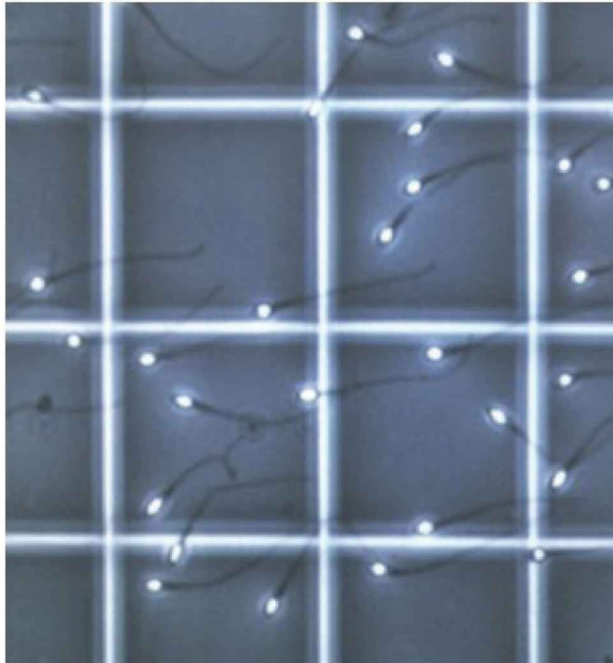
Range konsentrasi :

Sapi muda	$2x10^8$ sperm/ml	$8x10^9$ sperm/ml
Babi		$6\text{-}10x10^8$ sperm/ml
Kuda	$100\text{-}150x10^6$ sperm/ml	

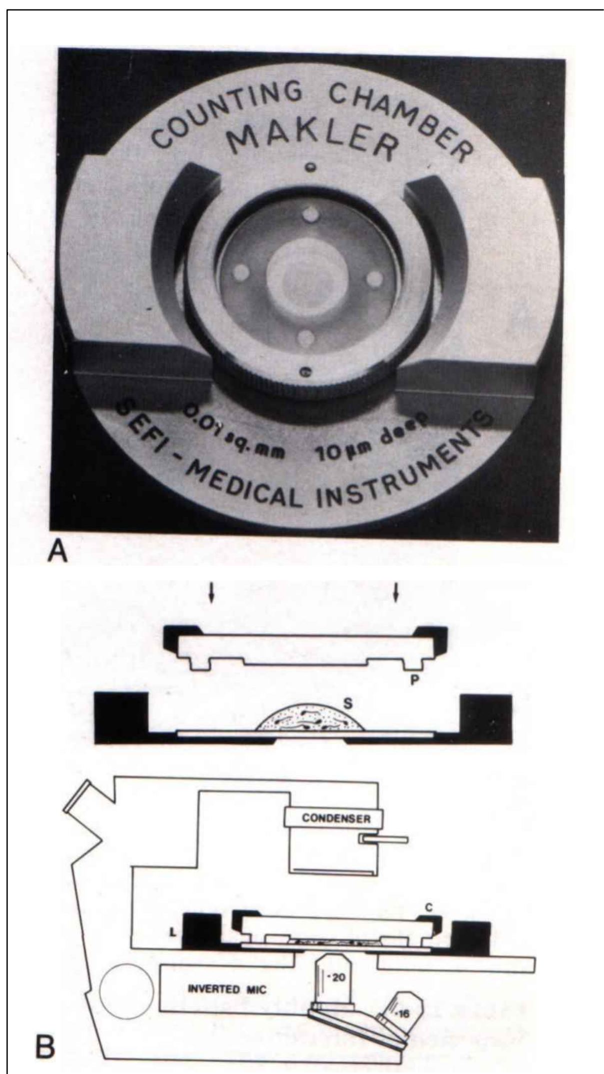


Gambar 5.3 Penghitungan spermatozoa dengan haemositometer (Hafez, 2008)

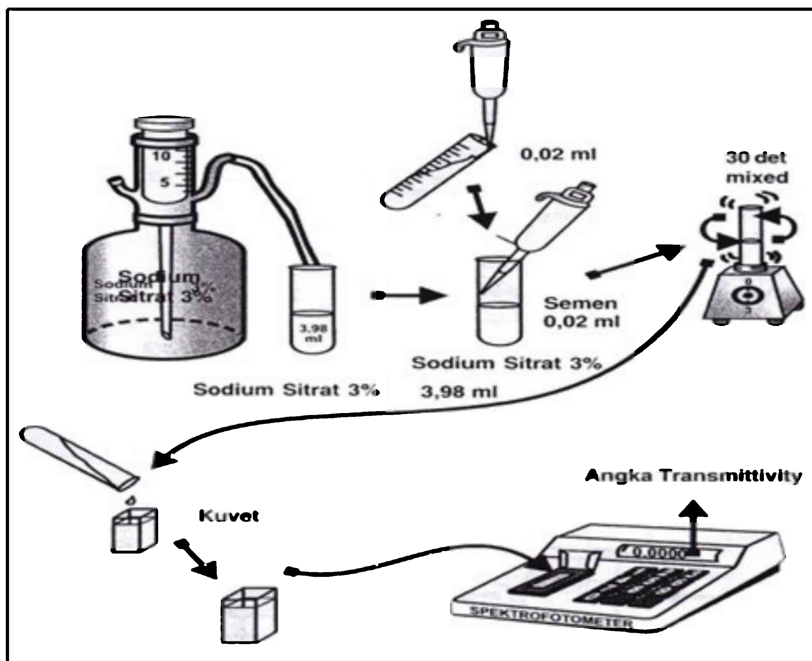




Gambar 5.4 Posisi spermatozoa yang dihitung dengan menggunakan haemositometer (Sumber The Royal Australian College of General Praktitionares, 22 sept 2010)



Gambar 5.5 Penghitungan spermatozoa dengan *chamber makler* (Hafez, 2008)



Gambar 5.6 Tahapan pengujian konsentrasi semen dengan *spectrofotometer* (Zenichiro dkk, 2002)

Tabel 5.4 Nomenklatur dari hasil semen analisis

Parameter	**Kriteria evaluasi**	**Nomenklatur**
Volume	Tidak ada	Aspermia
	Kurang	Hipospermia
	Kelebihan	Hiperspermia
Konsentrasi spermatozoa	Tidak ada	Azoospermia
	Kurang	Oligozoospermia
	Normal	Normozoospermia
	Kelebihan	Polyzoospermia
Pergerakan spermatozoa	Turun /kurang	Asthenozoospermia
Spermatozoa hidup	Semua mati	Necrozoospermia
Spermatozoa abnormal	Persentasenya tinggi	Teratozoospermia

(Ax, *et al*, 2008)

Konsentrasi semen pada berbagai ternak adalah sebagai berikut:

1. Konsentrasi semen pada sapi dengan kisaran 2 x 10^8 spermatozoa/ml pada pejantan muda sampai 1,8 x 10^9 spermatozoa/ml pada pejantan dewasa;
2. Konsentrasi spermatozoa pada fraksi yang kaya spermatozoa 6-10 x 10^8 spermatozoa/ml dengan final konsentrasi dipengaruhi oleh volume fraksi pre spermatozoa dan post spermatozoa lebih sedikit;
3. Jumlah spermatozoa kuda antara 100 x 10^6 sampai 150 x 10^6 spermatozoa/ml, dengan total volume antara 60–100, sehingga total spermatozoa 7–15 bilion per ejakulasi. Total spermatozoa ini dipengaruhi oleh musim, umur, frekuensi ejakulasi, ukuran testis dan penyakit reproduksi;
4. Normal konsentrasi semen domba berkisar antara 3,5 x 10^9 sampai 6,0 x 10^9 spermatozoa/ml. Domba pejantan dengan skore 0–2 tidak dapat digunakan (sesuai tabel 6.2);

Tabel 5.5. Konsentrasi semen domba hubungannya dengan konsistensi

Skor	Konsistensi	Jumlah spermatozoa (X10^9)	
		Rata-rata	Kisaran
5	Kental *cream*	5,0	4,5 – 6,0
4	*cream*	4,0	3,5 – 4,5
3	Encer *cream*	3,0	2,5 – 3,5
2	Susu	2,0	1,0 – 2,5
1	Susu encer	0,7	0,3 – 1,0
0	Bening (air)	Tidak terhitung	

5. Colorimeter tidak dapat untuk menghitung konsentrasi semen kambing karena warnanya bervariasi. Konsentrasi semen kambing lebih rendah dari domba. Konsentrasi semen kambing antara 2,5–5,0 x 10^9 spermatozoa/ml (Ax *et al,* 2008).

5. <u>Abnormalitas Spermatozoa</u>

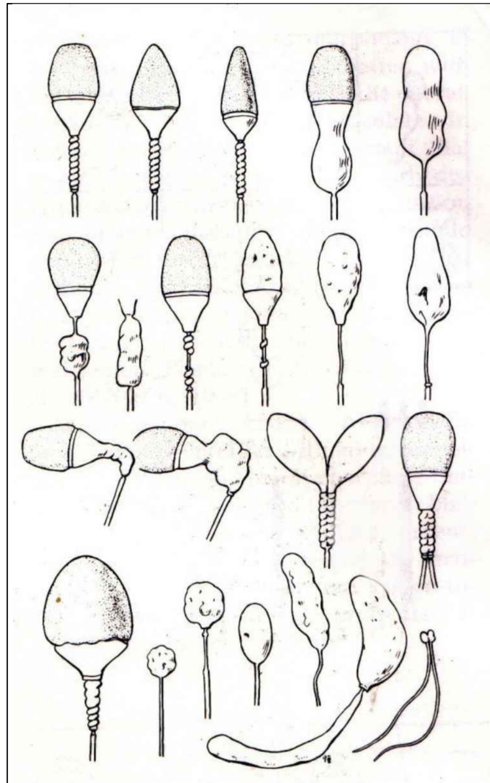
Penentuan jumlah dan macam abnormalitas spermatozoa di dalam suatu ejakulat harus dipakai bersamaan dengan pemeriksaan-pemeriksaan lain yang dilakukan segera setelah penampungan semen seperti penentuan motilitas, konsentrasi dan jumlah spermatozoa yang hidup dan mati.

Abnormalitas spermatozoa dapat dibedakan menjadi dua yaitu abnormalitas primer (seperti pada gambar 5.7 dan 5.8) dan abnormalitas sekunder.

Setiap sampel semen terdapat sel spermatozoa yang abnormal seperti pada gambar 5.7 dan 5.8. Morfologi abnormal pada spermatozoa berhubungan dengan fertilitas ternak. Stres panas yang paling banyak pengaruhnya terhadap kerusakan spermatozoa. Periode pada temperatur yang tinggi dan kelembapan yang tinggi lebih dari 6 minggu akan menyebabkan jantan steril. Besarnya jumlah spermatozoa yang abnormal juga terjadi pada saat periode *recovery*.

Abnormalitas sperma pada sapi sekitar 20% fertilitas akan menurun. Abnormalitas dibedakan menjadi primer, sekunder atau tersier. Abnormalitas primer yang berhubungan dengan kepala dan akrosom. Abnormalitas sekunder terjadi ketika adanya *sitoplasmic droplet* pada *mid piece* pada ekor. Abnormalitas tersier adalah kelainan pada ekor pada babi, persentase spermatozoa yang intak akromosomnya adalah penting untuk uji kualitas spermatozoa. Beberapa prosedur pewarnaan digunakan untuk pengaman morfologi. Integritas membran spermatozoa dapat dievaluasi menggunakan mikroskop fase kontras dengan memfiksasi sperma menggunakan *Glurakal dehide*. *Apical ridge* akrosom dapat dengan mudah diamati dan diklasifikasi yang tidak intak. Metode lain untuk melihat integritas membran juga dapat diamati menggunakan *Fluorochrome* H33258 juga mengamati morfologi dan viability. Pewarnaan menggunakan Giemsa digunakan untuk mengamati morfologi. Morfologi spermatozoa dapat diamati dengan mikroskop cahaya 1000 kali dengan menggunakan smear sperma yang dikeringkan cahaya. Pewarnaan yang spesifik dikembangkan secara umum menggunakan pewarna sel misalnya Giemsa, *Hematoxyllin-eosin* juga dapat digunakan pada sel germal dan sel somatis dalam smear semen dengan menggunakan pewarna background misalnya eosin-negrosin dan tinta india. Metode ini sering digunakan karena penggunaannya mudah.

Visualisasi secara mendetail dapat ditingkatkan dengan memfiksasi sel menggunakan Formol-salinatal larutan buffer Glutarol dehide. Pada sel yang tidak diwarnai menggunakan mikroskop fase kontras atau mikroskop differeus infokus kontras. Metode dengan fixasi untuk mencegah perubahan atau kerusakan akibat pewarnaan.

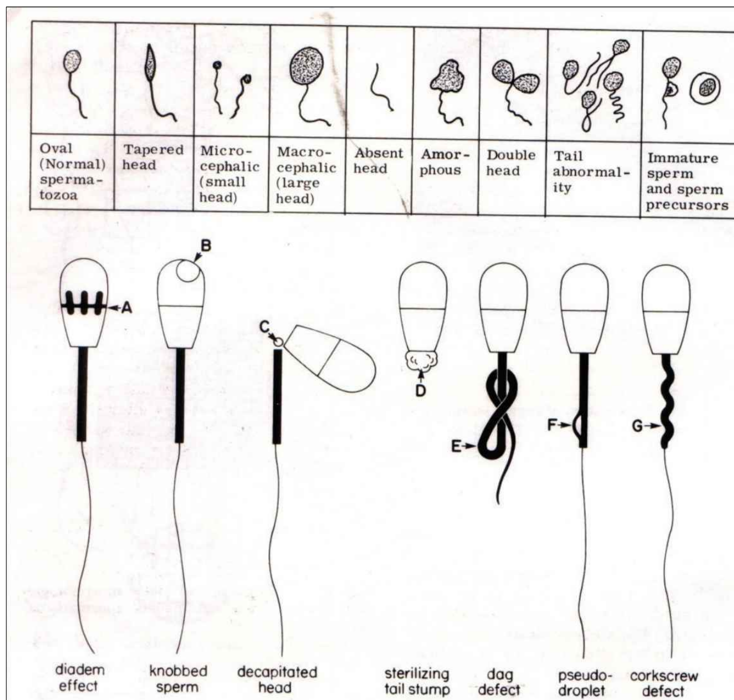


Gambar 5.7 Gambar Abnormalitas Spermatozoa (Ax *et al*, 2008)

Dua ratus spermatozoa dievaluasi ada tidaknya abnormalitas morfologi yang spesifik adalah kerusakan akrosom, *protoplasmic droplet* bagian proximal, penggelembungan bagian *midpiece* dan melingkar pada bagian ekor. Persentase morfologi normal dalam sampel semen mirip atau sesuai dengan persentase motilitas. Bila motilitasnya rendah tetapi morfologinya normal menunjukkan terjadinya kesalahan pemeriksaan laboratorium pada rendahnya motilitas.

Pada domba, terdapat korelasi positif antara morfologi normal dengan motilitas spermatozoa pada setiap semen yang diejakulasikan terdapat spermatozoa abnormal, ketika sudah 20% atau lebih maka fertilitas pejantannya dipertanyakan, semen yang mempunyai abnormalitas 15% tidak dapat digunakan untuk IB (Ax *et al*, 2008). Morfologi spermatozoa dapat diuji dengan pewarnaan eosin negrosin atau pewarnaan Wright'a dan Williams'stains dengan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Paling kurang 150 spermatozoa yang diamati dan kategori spermatozoa yang abnormal ada 5 kategori yaitu

1. Tidak ada ekor;
2. Abnormal kepala;
3. Bentuk ekor abnormal;
4. Bentuk ekor abnormal dengan adanya sitoplasmic droplet pada bagian proximal;
5. Bentuk abnormal ekor dengan distal droplet.



Gambar 5.8 Spermatozoa mengalami kelainan (Ax *et al*, 2008)

Abnormalitas spermatozoa primer adalah terjadi saat proses spermatogenesia, sedangkan abnormalitas sekunder adalah setelah proses spermatogenesis hingga ejakulasi juga saat proses prosesing spermatozoa.

6. Kualitas semen pada ternak

Pada sapi, uji kualitas semen beku adalah gabungan antara motilitas spermatozoa dan akrosom intak. Dua *straw* yang 0,5 ml atau 0,25 ml di *thawing* dalam 95°C dalam *water bath* setelah 45 detik, satu *straw* diangkat dan dikeringkan dengan handuk di sisi yang tidak ada penutup kapasnya dipotong. Setetes semen ditaruh di *slide* yang ditutup dengan *cover glass*, selanjutnya diamati menggunakan mikroskop dengan pembesaran 100–400 kali. Mikroskop dengan optik *inferens contras* (nomarski) 1000 kali dengan menggunakan minyak emersi dapat digunakan untuk menentukan abnormalitas spermatozoa dan intak akrosom. Setelah itu *straw* yang kedua diinkubasi 3 jam pada suhu 95°C untuk melihat penutup akrosom yang terletak di bagian 2/3 anterior kepala. Pada akrosom terdapat korelasi antara persentase akrosom intak setelah 3 jam inkubasi dengan fertilitas.

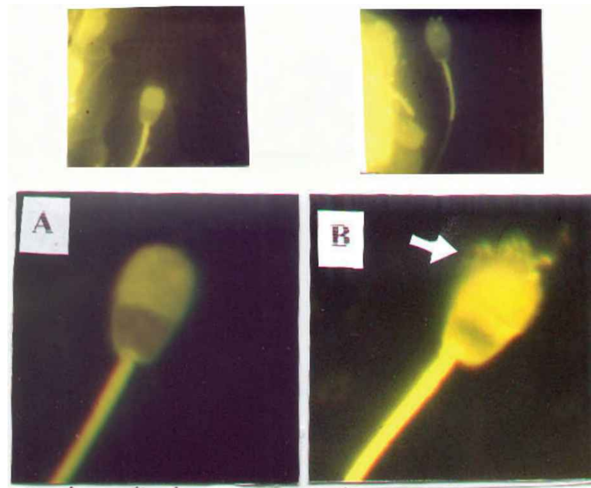
Tes yang paling akurat untuk mengukur fertilitas babi jantan yang menentukan adalah kebuntingan dan lahir hidup. Walaupun banyak kriteria yang dapat menentukan status tingginya kualitas spermatozoa yang sub optimal, tidak ada satu parameter in vitro yang dapat digunakan untuk prediksi babi jantan (Ax *et al*, 2008).

Semen domba dengan kualitas tinggi yaitu sebagian besar motilitas 85%, abnormalitas < 10%. Total spermatozoa yang motil per inseminasi lebih penting dibandingkan persentase abnormalitas, karena hanya satu spermatozoa yang melakukan penetrasi zona pelusida ovum dan telah dipercaya bahwa bukan satu faktor yang mempengaruhi fertilitas semen.

7. Teknik Pemeriksaan kerusakan membran spermatozoa

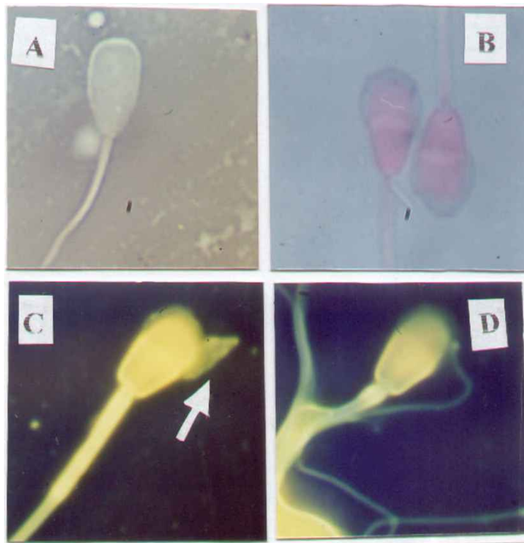
Membran merupakan bagian terluar dari spermatozoa yang berfungsi untuk melindungi spermatozoa, sehingga apabila membrannya fungsi dan atau strukturnya rusak maka spermatozoa akan mati, dan hanya spermatozoa yang membrannya utuh sajalah yang mampu melakukan fertilisasi. Oleh sebab itu di dalam proses penyimpanan spermatozoa harus dijaga membrannya.

Kerusakan membran pada umumnya dengan menggunakan mikroskop elektron karena harus dilakukan pada pembesaran 10.000 kali, akan tetapi juga dapat dilakukan pengamatan kerusakan membran dengan pembesaran 1000 kali yaitu bagian lensa objektif 100 kali sedangkan okuler 10 kali. Pada gambar 5.9 ditunjukkan dengan pewarnaan chlortetrasiclin dan diamati dengan mikroskop epifluorescen dapat diamati membran yang utuh dan yang rusak.



Gambar 5.9 Spermatozoa normal dan abnormal pada membrannya menggunakan pewarnaan CTC dan diamati dengan mikroskop epi fluorescent (A) Normal, (B) kerusakan membran (Susilawati, 2000)

Kerusakan membran juga dapat dilakukan dengan pewarnaan eosin negroin dengan pengamatan 1000 kali dengan mikroskop cahaya seperti gambar 5.10.

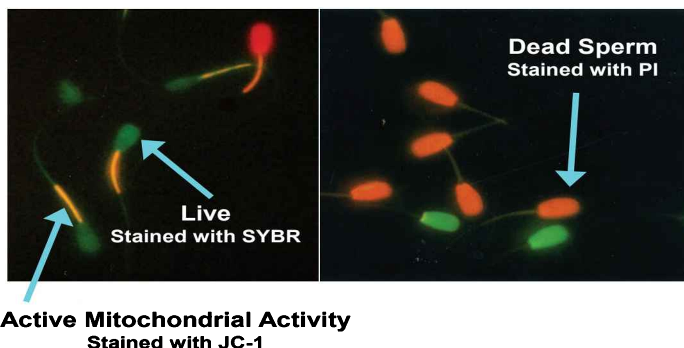


Gambar 5.10 Spermatozoa normal dan abnormal pada membrannya (Susilawati, 2000)

(A) normal (B) membran menggelembung pewarnaan eosin negrosin (C) membran yang rusak sedang (D) membran yang utuh menggunakan pewarnaan CTC dan diamati dengan mikroskop epi fluorescent



Gambar 5.11 Spermatozoa yang melalami kerusakan akrosom Pewarnaan eosin negrosin dengan pembesaran 1000 kali

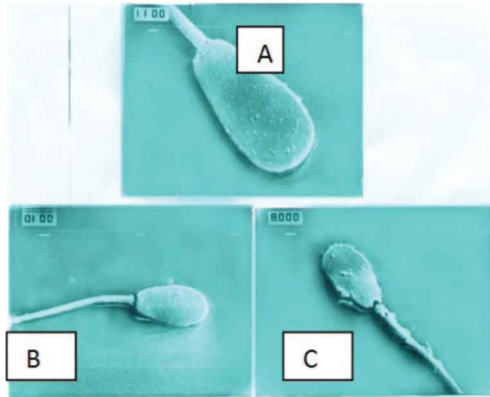


Gambar 5.12 Hasil evaluasi integritas sperma dengan menggunakan mikroskop fluoressen. (Gambar dibuat Dr. Duane L. Garner, University of Nevada)

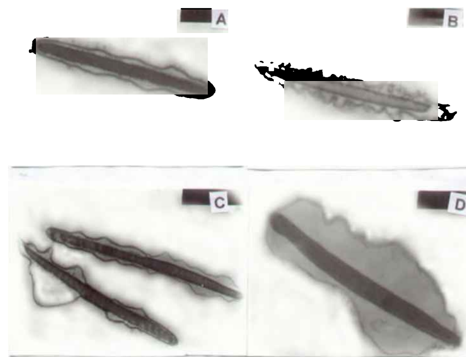
8. **<u>Pengamatan membran spermatozoa dengan mikroskop elektron</u>**

Mikroskop cahaya mempunyai batas maksimal yaitu 1000 kali sehingga bila digunakan untuk mengamati spermatozoa secara detil sangat terbatas. Struktur abnormalitas spermatozoa dapat dideteksi dengan *scanning* dan atau transmisi electron microscopy (SEM/TEM), akan tetapi sangat mahal . Dengan menggunakan kedua alat ini didapatkan detail resolusi yang tinggi untuk menentukan morfologi spermatozoa, visualisasi tiga dimensi dapat menggunakan SEM, sedangkan jika menggunakan TEM potongan spermatozoa dapat diamati ultra struktur secara detail.

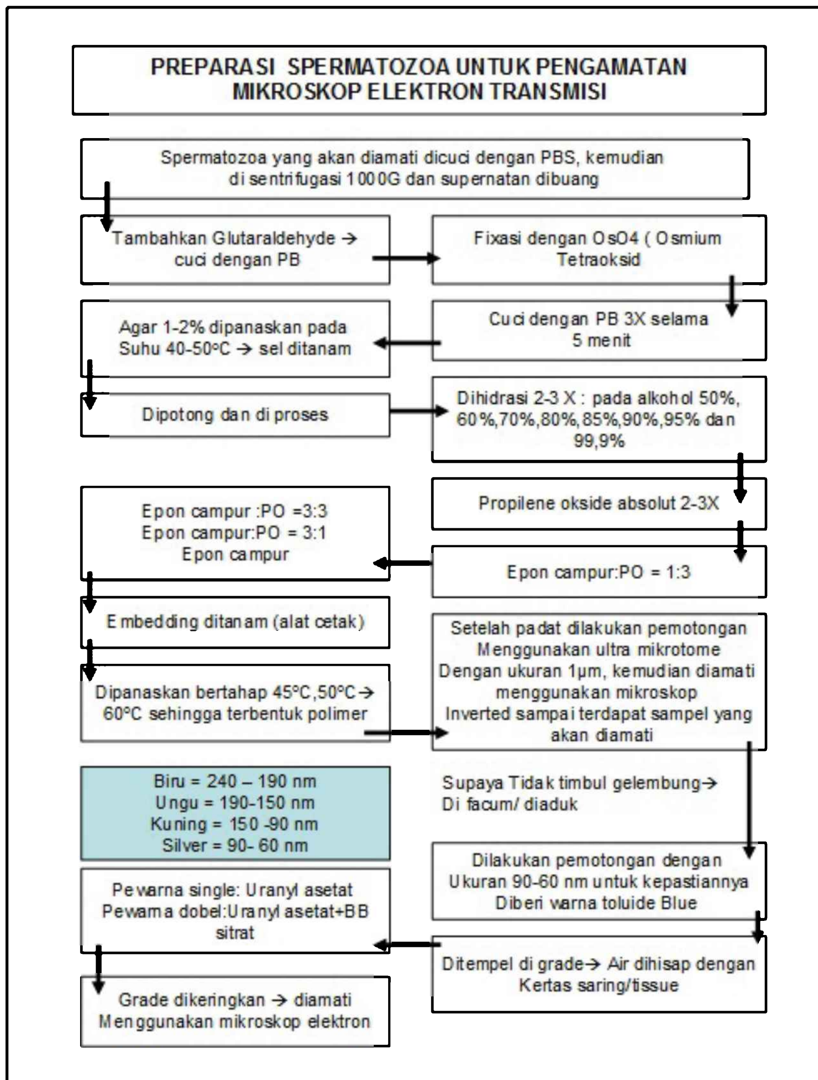
Kerusakan membran spermatozoa lebih jelas dapat menggunakan mikroskop elektron yaitu dengan menggunakan Scanning Elektron Microskop (SEM), selain itu juga dengan Transmisi Elektron Microskop (TEM)



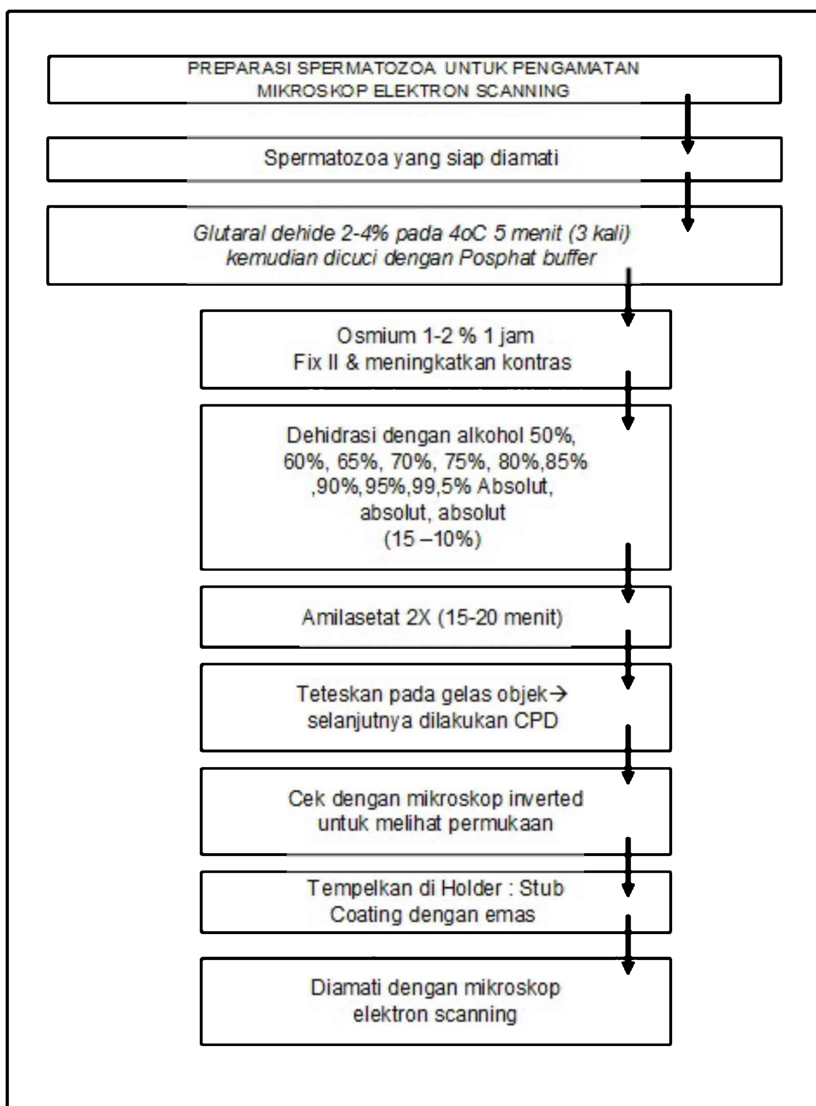
Gambar 5.13 Spermatozoa normal dan abnormal pada membrannya diamati dengan Scanning elektron Microskop (A) Normal, (B,C) kerusakan membran (Susilawati,2000)



Gambar 5.14 Kerusakan membran spermatozoa, pengamatan menggunakan transmisi electron mikroskop (Susilawati, 2000)



Gambar 5.15 Flowchart preparasi spermatozoa untuk pengamatan mikroskop elektron transmisi (Susilawati, 2000)



Gambar 5.16 Flowchart preparasi spermatozoa untuk pengamatan mikroskop elektron scanning (Susilawati, 2000)

5.2.1 Pengamatan kapasitasi spermatozoa dengan pewarnaan Chlortetracycline (CTC)

1. Persiapan Reagen

Langkah 1 : Pembuatan Larutan DABCO

1. 250 mg DABCO (D-2522) dilarutkan dalam 9 ml gliserol (ditempatkan dalam tabung yang dibungkus aluminium foil agar terlindung dari sinar).
2. Diletakkan pada *waterbath* dengan temperatur 37°C selama 3-4 jam dan dikocok dari waktu ke waktu.
3. Tambah 1 mililiter PBS dulbecco's ke dalam larutan dan dicampur hingga merata.
4. Larutan dibagi dalam 3 tabung tertutup yang dibungkus dengan aluminium foil dan disimpan di freezer.

Langkah 2 : Pembuatan CTC Buffer 20mM NaCL

1. 0.2422 gram tris (Trizma base, Sigma T-1503) dan 0.7592 gram NaCL dilarutkan kedalam 100 mililiter *Diionized water.*
2. Kemudian dicampur, disaring dan disimpan dalam refrigerator.

Langkah 3 : Fixative Buffer : 1 M Tris (Trizma base Produksi Sigma T-1503)

1. 6.057 gram Tris dilarutkan dalam 50 mililiter *Diionized Water.*
2. Kemudian dicampur, disaring dan disimpan dalam refrigerator.

Langkah 4. *Paraformaldehyde* 25% (Sigma P-6148).

1. 12.5 gram *paraformal dehyde* dilarutkan dalam 50 mililiter *Diionize Water* yang dikerjakan di ruang asam (lemari uap).
2. Larutan dipanaskan sambil di*stirer* sampai berwarna putih susu (5 sampai 10 menit) dan di tambahkan 1 M NaOH sampai larutan menjadi terang.

Langkah 5. CTC Fixative : 12.5% Paraformaldehyde dalam 0.5 Tris.

1. Larutan *paraformaldehyde* (langkah 4) dicampur dengan larutan *buffer* 1 M Tris (langkah 3) 1:1.

2. PH diatur sampai 7.4 dengan 0.2 M HCL secara hati-hati, selanjutnya disimpan dalan refrigerator.

Langkah 6. Larutan Pewarna CTC

1. 0.0044 gram CTC powder (Sigma C-7880) dimasukkan dalam tabung yang dibungkus dengan aluminium foil ditambahkan 0.0044 gram L-Systein (*Hydrochloride Monohydrate*) dan ditambahkan 5 mililiter *CTC Buffer* (Langkah2).
2. PH diatur sampai 7.8 dengan 0.2 M HCL secara hati-hati.

Catatan : Ada 3 reagen akhir yaitu :

1. Larutan DABCO
2. Larutan CTC Fixative
3. Larutan Pewarna CTC

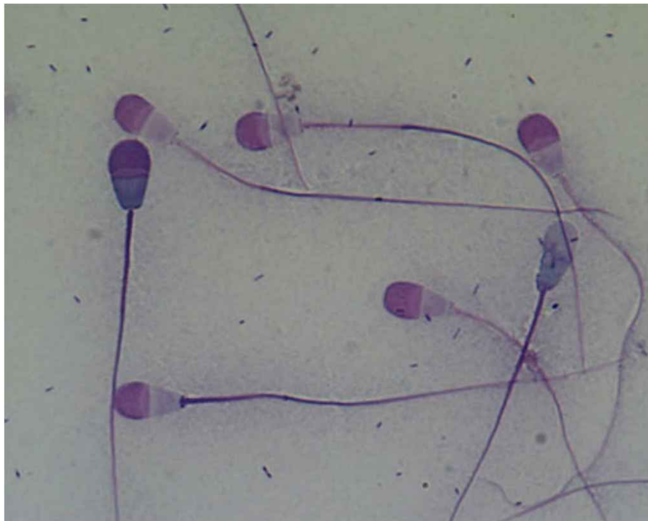
Metode yang digunakan adalah modifikasi metode yang diuraikan oleh Fraser (1995) dengan cara sebagai berikut: 45 µl larutan pewarna CTC dimasukkan dalam tabung ependorf kapasitas 1,5 ml yang ditutup dengan aluminium foil, lalu ditambah 8 µl CTC fiksatif dan divortex selama 1 menit, larutan tersebut diambil 10 µl dan ditempatkan pada *object glass*, kemudian ditambahkan 10 µl DABCO dan dicampur secara hati-hati kemudian ditutup dengan *cover glass*, selanjutnya ditutup dengan kertas tissue yang tebal dan ditekan secara hati-hati, selanjutnya tepi *cover glass* ditutup dengan *cutex*. Gambaran yang tampak adalah 1) Kepala spermatozoa keseluruhan berwarna terang adalah spermatozoa yang belum kapasitasi 2) Kepala spermatozoa separuh bagian atas berwarna terang adalah spermatozoa yang mengalami kapasitasi 3) Kepala spermatozoa tidak berwarna terang dan hanya bagian tengah saja yang terang adalah spermatozoa yang mengalami reaksi akrosom.

5.2.2.Evaluasi status akrosom dengan FITC- Con A dan methileen Blue

Spermatozoa difiksasi dengan 4% *formal dehyde*, kemudian dicuci dengan penambahan PBS 3 ml dan disentrifugasi 4000 G selama 30 menit, kemudian dibuang supernatannya dan dimasukkan 0,1 ml FITC con A (Sigma) yang mengandung 10 µg/ml dalam

PBS dulbeccos. Staining dilakukan selama 25 menit pada suhu ruangan, selanjutnya dicuci 2 kali dengan sentrifugasi 4000G selama 10 menit, supernatan dibuang dan endapan ditaruh pada slide, ditetesi 90% gliserol selanjutnya diamati dengan pembesaran 400 kali dengan mikroskop *Fluorescent* (Nikon, Japan). Tiap spesimen diamati dengan epifluorescen ellumination dengan *excitation* B (*Excitation* 490 nm dan Emisi 525 nm) untuk mengamati terdapatnya *fluorescent* pada spermatozoa hasil FITC dengan menggunakan modifikasi dari metode Nishikima (1997).

Metode dengan menggunakan methileen blue juga dapat digunakan untuk melihat status akrosom yaitu menempatan semen yang akan dinilai dan ditempatkan ke *water bath* bersuhu 37°C selama 10 menit, kemudian diatas *object glass* ditambahkan methileen blue atau eosin 2,9% kemudian diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 -1000 kali (Bamba, 1988).



Gambar 5.17 Hasil pengamatan status ekrosom dengan methileen Blue (Pewarnaan akrosom jurnal, file 18 Oktober 2010)

5.2.3.*Hypoosmotic swelling Test* (HOS TES).

Integritas membrane sel dapat diuji menggunakan Hypoosmotic swelling (HOS)-test dan akrosom utuh. Uji HOS dilakukan

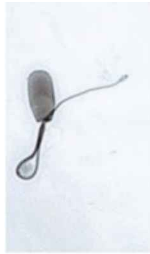
menggunakan modifikasi mengikuti metode Jeyendran *et al* (1984), serta Correa dan Zavos (1994). Secara prinsip Hos tes untuk melihat status membrane, karena integritas membrane berpengaruh terhadap viabilitas spermatozoa (Lenchniak *et al*,2002). Spermatozoa dengan membrane utuh, jika ditempatkan pada media hipoosmotik akan berusaha meningkatkan volume air didalam tubuhnya agar cairan di dalam dan di luar spermatozoa tetap seimbang. Upaya ini menyebabkan terjadinya penyempitan pada membrane yang menutupi ekor, sehingga memaksa ekor spermatozoa melingkar di dalam membrane spermatozoa (Cabrita *et al*, 1999). Proses menggelembung diawali pada bagian ujung ekor, dilanjutkan bagian tengah dan kepala sehingga menyebabkan kepala menggelembung (Jeyendran *et al*, 1984). Sehingga jika ekornya menggelembung atau melingkar berarti membrannya utuh atau spermatozoa motil, bisanya untuk pengalamatan diberi pewarna eosin untuk menilai integritas membrannya (Roca *et al*, 2006 ; Neild *et al*, 1999).

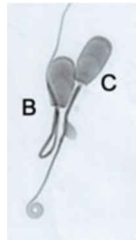
Urutan kerja HOST test sebagai berikut: 1 ml larutan hipoosmotik 150 m osmol (yang dibuat dari 7,35 gram natrium sitrat. $2H_2O$, 13.52 gram fruktosa dilarutkan dalam 1000 ml aquades) ditambah dengan 0.1 ml spermatozoa kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, selanjutnya diamati dengan pembesaran 400 kali perubahan yang khas yaitu adanya pembengkakan atau ekornya melingkar pada bagian ujungnya .



Gambar 5.18 Spermatozoa Normal dan abnormal pada Integritas membrannya (Susilawati, 2000). Pengamatan dengan teknik Hipo osmotik sweling tes (Host-tes)

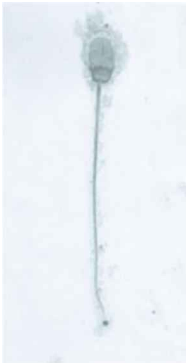
(A) Normal (Bagian ekor melingkar dan membran menggelembung) (B) membran tidak normal (Ekor lurus).

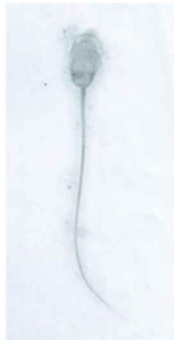






A







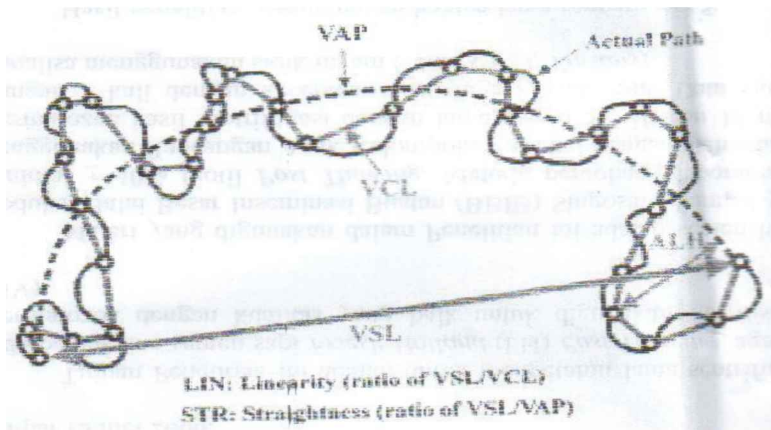
E E E

Gambar 5.19 Hasil Uji Integritas membran babi (Rahmawati dkk, 2010). Pengamatan dengan teknik Hipo osmotik sweling tes (Host-tes)

(A,B,C) spermatozoa normal (Bagian ekor melingkar dan membran menggelembung) (D,E) membran tidak normal (Ekor lurus dan tampak membran pada kepalanya menggelembung).

5.3 CASA

Ax *et al* (2008) menyatakan beberapa prosedur telah dikembangkan untuk pengujian yang obyektif antara lain: time-lapse *photomicrography, frame-by-frame playback videomicrography, spectrophotomicrography* dan *computerize analysis. Computer Assisted Semen Analysis* (CASA) sistem digunakan pada laboratorium rujukan. Dengan CASA, produksi semen beku oleh produsen dapat berjalan lebih profesional dan efisien .Beberapa parameter CASA diantaranya adalah VAP (*average path velocity*, µm/detik) adalah waktu rata-rata kecepatan dari spermatozoa sepanjang alur jalannya; VCL (*straight line velocity*, µm/detik) adalah waktu kecepatan rata-rata spermatozoa pada garis lurus diantara awal gerak sampai akhir gerak saat deteksi; VCL (*curve linear velocity*, µm/detik) adalah kecepatan rata-rata dari setiap titik gerak sepanjang alur; ALH (*amplitude of lateral head movement*, µm) adalah jarak dari lateral letak gerakan kepala sperma pada setiap rata-rata alur; LIN (*Linearity*, %) adalah *linearity* dari alur *curve linear* (hasil dari VSL/VCL); STR (*Straightness*,%) adalah *linearity* dari rata-rata alur (hasil dari VSL/VAP); BCF (*beat cross frequency*, hertz) adalah rata-rata alur *curve linear* spermatozoa melewati rata-rata alurnya (Gambar 5.20).



Gambar 5.20 Kecepatan dan Gerak Spermatozoa

CASA memberikan analisis yang cepat, obyektif, akurat dan *repeatable* dari beberapa ratus spermatozoa per sampel

konsisten, lengkap, permanen, dan aman. Sampel semen dapat dievaluasi tidak hanya motilitas secara umum saja, juga dapat membedakan setiap pola gerakan yang menyediakan nilai awal diagnose kemampuan fertilitas (Anonimous, 2004).

Analisa dilakukan dengan mengalikan lapang pandang (*screen),* lebih dari 95 spermatozoa per lapang pandang sebanyak 20 kali, ke dalaman *chambe*r 10–80 μ, parameter motilitas yang digunakan sesuai dengan criteria WHO (*World Health Organization*), memberikan data analisis per individu sel, per lapangan dan per sample, dengan analisis dilakukan dalam waktu kurang dari 2 detik per lapangan pandang.

Pada analisis 18 parameter motilitas dilakukan dengan menggunakan CASA secara otomatis dengan jumlah sel yang dapat dianalisis minimal 200. Langkah pertama analisis akan didapatkan klasifikasi sel pada level 1 yaitu motilitas dan motilitas progresif. Motilitas adalah semua sel yang motil tidak termasuk sel yang tidak motil. Motilitas progesif adalah semua sel yang bergerak maju ke depan tidak termasuk yang bergerak lokal (motil lokal). Lokal motil adalah sel yang hidup tetapi bergerak maju sangat sedikit. Pada level ini setiap kriteria sel ditandai dengan warna tertentu, pada sel yang motil progresif terdapat tanda warna hijau, tidak motil berwarna merah, lokal motil berwarna biru dan hiperaktif berwarna ungu. Pada klasifikasi level 2 terdiri dari evaluasi hiperaktif, *linear, non linear* dan *curve linear* yang merupakan informasi motilitas sampel yang dianalisis. Selanjutnya analisis dilanjutkan untuk data sel secara detail yang meliputi DCL, DAP, DSL, VCL, VAP, VSL, LIN, STR, WOB, BCF, ALH, AOC.

Spermatozoa juga diklasifikasikan dalam tiga grup berdasarkan kecepatannya yaitu total motil (semua spermatozoa yang bergerak lebih dari 10 μm per detik), progresif motil (semua spermatozoa yang bergerak maju lebih dari 20 μm per detik) dan local motil (semua spermatozoa yang bergerak pada 10 – 20 μm per detik). Motil progresif dibagi dalam tiga grup tergantung dari nilai S/V (*straight line velocity* <μm/detik>), bila nilai 0,9–1,0

dikategorikan *Linear Forward;* bila nilai 0,8–0,9 dikategorikan *Non Linear Forward* dan bila 0,0–0,8 dikategorikan pola gerakan lain.

Terdapat tiga kelompok pola motilitas spermatozoa yang dapat dianalisis menggunakan CASA yaitu kelompok hiperaktifasi yang memiliki nilai VCL≥100 µm/detik, LIN<60% dan ALH≥5 µm; kelompok non hiperaktifasi apabila nilai VSL≥40 µm/detik, LIN≥60% dan ALH<5 µm/detik serta kelompok transisi yang memiliki nilai diantaranya. Angka fertilitas pada kelompok hiperaktifasi memiliki keberhasilan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok non hiperaktifasi. Dinyatakan bahwa pengujian pola motilitas hiperaktifasi menggunakan CASA dapat menjadi upaya yang baik untuk memprediksi kemampuan fertilisasi spermatozoa. Ripp *et al.* (2003) menyatakan bahwa hiperaktifasi ditandai dengan LIN>65%, VCL>100 µm/detik dan ALH>7.5 µm/detik.

Susilawati dkk (2000) menyatakan bahwa hiperaktifasi spermatozoa diperlukan sesaat sebelum reaksi akrosom secara *in vitro* sama dengan secara *in vivo* yaitu pergerakan dalam oviduk saat fertilisasi. Mula-mula spermatozoa berenang dalam bentuk linear mulai menunjukkan gerakan tunggal yang ditandai gerakan ekor seperti tali cambuk dan dihentikan dengan gerakan lurus-lurus pendek. Saat hiperaktifasi spermatozoa mempunyai daya dorong yang tinggi, hal ini untuk bergerak menuju ampula dan untuk menembus *zona pellucida* yang keras. Terdapat korelasi positif antara motilitas spermatozoa terhiperaktifasi dengan kemampuan spermatozoa menembus zona.

Hiperaktifasi spermatozoa ditandai dengan perubahan pola gerakan yang cepat dengan amplitudo yang luas/lebar dan membentuk gerakan *whiplash* dari *flagelum.* Selama hiperaktifasi spermatozoa menunjukkan peningkatan VCL dan penurunan linearity. Keberhasilan fertilisasi spermatozoa harus mampu merespon secara baik rangsangan eksternal yang meliputi *protein kinase* yang mengatur fungsi flagelar.

Hiperaktifasi spermatozoa ditunjukkan dengan gerak maju cepat *non linear*, selama hiperaktifasi terjadi perubahan

drastis pada pola gerak spermatozoa. Pola gerakan berubah menjadi random dan sirkuler tidak progresif dan dinyatakan sebagai *whiplash* atau gambar angka 8. Peningkatan amplitudo dari ALH, peningkatan VCL dan penurunan LIN.

Terdapat korelasi positif diantara VSL, LIN, BCF dengan motilitas spermatozoa dan korelasi negatif diantara MAD (*Mean Angular Displacement*) dengan motilitas spermatozoa. *Velocity* dan *linearity* spermatozoa memberikan kontribusi pada motilitas spermatozoa dan merupakan karakteristik penting dari fungsi spermatozoa.

Beberapa standar parameter motilitas menggunakan CASA pada berbagai jenis ternak sebagaimana dapat dilihat pada Tabel 5.6, menyatakan tidak ada perbedaan pada VAP, VSL, VCL, ALH, STR, LIN dari semen yang dikoleksi menggunakan vagina buatan dan elektroejakulator, namun konsentrasi spermatozoa menggunakan vagina buatan lebih tinggi daripada elektroejakulator.

Tabel 5. 6. Standar Parameter Motilitas Menggunakan CASA pada Beberapa Hewan

Spesies	Jangkauan		Klasifikasi Level 1		Klasifikasi Level 2			
	Area dari	[μm] smp.	Non motil	Lokal motil	Hiperaktif	Linear	*Non-Linear*	Curve-Linear
Babi	25	120	AOC<2,2	DSL<4,5	VLC>80	STR>0,9	STR≤0,9	DAP/
					LIN<0,65	LIN>0,5	LIN<0,5	Diameter ≥30
					ALH>6,5			LIN<0,5
Sapi	22	88	AOC<5,0	DSL<4,5	VLC>80	STR>0,5	STR≤0,5	DAP/
					LIN<0,65	LIN>0,35	LIN<0,35	Diameter ≥30
					ALH>6,5			and
								LIN<0,5
Tikus	10	70	AOC<5,0	DSL<4,5	VLC>80	STR>0,5	STR≤0,5	DAP/
					LIN<0,65	LIN>0,35	LIN<0,35	Diameter ≥30
					ALH>6,5			and
								LIN<0,5
Kuda	14	80	AOC<9,5	DSL<6,0	VLC>80	STR>0,9	STR≤0,9	DAP/
					LIN<0,65	LIN>0,5	LIN<0,5	Diameter ≥30
					ALH>6,5			and
								LIN<0,5

Domba	28	50	AOC<5,0	DSL<4,5	VLC>80 LIN<0,65	STR>0,5	STR≤0,5	DAP/
					ALH>6,5	LIN>0,35	LIN<0,35	Diameter ≥30
								LIN<0,5
Kambing	20	70	AOC<5,0	DSL<4,5	VLC>80	STR>0,5	STR≤0,5	DAP/
					LIN<0,65	LIN>0,3	LIN<0,3	Diameter ≥ 30
					ALH>6,5			LIN<0,5
Rusa	22	60	AOC<5,0	DSL<4,5	VLC>80	STR>0,5	STR≤0,5	DAP/
					LIN<0,65	LIN>0,4	LIN<0,35	Diameter ≥ 30
					ALH>5,0			LIN<0,5

VAP, VSL, LIN, STR merupakan indikator motilitas progresif sedangkan VCL, ALH dan BCF merupakan indikator *vigor* spermatozoa. STR dan LIN juga menjelaskan *swimming pattern* spermatozoa.

Kemampuan fertilisasi spermatozoa berhubungan dengan penurunan VSL, namun belum jelas bagaimana parameter motilitas spermatozoa berhubungan dengan penurunan atau peningkatan fertilitas. Penurunan motilitas spermatozoa akan menyebabkan penurunan angka fertilitas. CASA dapat digunakan untuk mendeteksi pengaruh beberapa faktor seperti pH air, temperatur, penghambat motilitas dan uji keracunan yang merupakan pengaruh potensial dari lingkungan spermatozoa serta kemampuan reproduksinya.

5.3.1Uji Kualitas spermatozoa yang lain.

1. *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA)

Metode *flowcytometry* dapat dikembangkan untuk mengevaluasi struktur integritas membrane pada kromatin spermatozoa dengan mengukr jumlah double stranded dan *single stranded* DNA didalam populasi spermatozoa. SCSA dapat digunakan untuk mengidentifikasi spermatozoa sapi atau kda yang sub fertile. SCSA dapat di "screen" 5000 sampai 1000 spermatozoa dalam beberapa menit.

2. Fluoresen yang lain.

Pemeriksaan fluoressen yang lain yang dapat digunakan untuk mengevaluasi fungsi spermatozoa dengan menggunakan mikroskop atau flowsitometer. Penghitungan ini sangat berarti karena memberikan informasi yang mendetail gambaran integritas membrane dan potensi membrane mitochondria.

3. Analisis biokimia seminal plasma atau sekresi pada saluran reproduksi betina

Dengan mengetahui konsentrasi elektrolit, konsentrasi protein atau komposisi protein spesifik pada seminal plasma bukannya metode yang baik untuk memprediksi informasi motilitas

post *thawing* pada medium pembekuan spermatozoa. Dua protein yang berasal dari epididimis adalah penanda potensial fertilitas yaitu osteopontin dan lipocalin- 1 – like prostaglandin D synthase Deoxyribonuclease – 1 like enzim dan tipe 2 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2) disekresai oleh kelenjar asesori saat ejakulasi dan mengikat spermatozoa saat melewati alat reproduksi jantan dan juga bergabung dengan faktor-faktor penyebab fertilitas jantan.

Glycosaminoglycan adalah komponen yang dihasilkan oleh saluran betina, bergabung dengan spermatozoa sapi dapat menyebabkan reaksi spermatozoa secara in vitro. Korelasinya besar antara stimulasi reaksi akrosom oleh slycoaminoglycans dan pejantan setelah NRR 60-90 (Ax *et al*, 2008)

5.3.2 Produksi Semen

Evaluasi tentang kualitas semen tidak dapat dilakukan hanya dengan satu parameter uji kualitas saja, akan tetapi lebih sesuai jika menggunakan penggabungan dari beberapa parameter diatas, sehingga lebih mudah didalam melakukan evaluasi, terutama didalam menguji produksi semen dari seekor ternak.

Total spermatozoa = Volume semen x Konsentrasi
Total Spermatozoa yang motil
= Volume semen x Konsentrasi
x Persentase motilitas Individu
Total spermatozoa yang hidup
= Volume semen x Konsentrasi
x Persentase spermatozoa yang hidup
Total Spermatozoa yang abnormal
= Volume semen x Konsentrasi
x Persentasi spermatozoa yang abnormal.

Hal – hal yang harus dilakukan sebelum bekerja

1. Cuci tangan sebelum kerja dengan air bersih lalu didisinfeksi dengan *alcohol;*
2. Gunakan baju kerja, penutup kepala (masker) dan sandal khusus untuk di laboratorium (sandal untuk di luar laboratorium tidak boleh digunakan di dalam laboratorium);

3. Pintu laboratorium harus dalam keadaan tertutup;
4. Membuang kotoran/sampah dan debu yang ada di dalam laboratorium (gunakan *vacum cleaner* untuk membersihkan debu);
5. Tidak memasukkan barang-barang yang tidak digunakan di dalam laboratorium atau pisahkan barang-barang yang tidak digunakan didalam laboratorium;
6. Tidak boleh makan, minum, dan merokok di dalam laboratorium.

5.3.3.Pemeriksaan Semen

A. Pemeriksaan harus dilakukan dengan teliti dan hati – hati

1. Pemeriksaan harus dilakukan dengan cepat agar energi spermatozoa tidak cepat habis;
2. Pemeriksaan harus dilakukan secara beruntun;
3. Pengaturan peralatan dan pemeriksaan harus dilakukan secara beruntun.

B. Untuk Menghindari Terjadinya Temperatur Shock, Maka Penurunan Temperatur Semen Harus Dilakukan Secara Perlahan/Bertahap.

1. Hindari adanya *temperature shock* saat pemeriksaan;
2. Siapkan *water bath* bersuhu 33°C (suhu ini mendekati suhu semen). Letakkan peralatan gelas dan larutan pengencer A yang akan dipakai pada *water bath;*
3. Siapkan *water bath* dengan suhu 20°C semen dengan *pre-dilution* dalam gelas 33°C dimasukkan ke *water bath* bersuhu 20°C selanjutnya akan disimpan;
4. Letakkan peralatan gelas dan larutan pengencer A yang akan dipakai dalam lemari pendingin (*Cool Top*) bersuhu (4–5)°C.

C. Pemeriksaan Semen Secara Visual

1. Amati dan catat volume semen yang tertampung untuk tiap penampungan (rata-rata 4–10 ml);
2. Amati dan catat warna semen (yang normal berwarna putih kekuningan krem);
3. Ciri-ciri fisik semen yang abnormal yaitu mengandung air,

darah, rambut preputium, nanah,air kotor dan bau yang tidak normal;

4. Amati dan catat viskositas semen.Viskositas semakin tinggi berarti konsentrasi spermatozoa semakin tinggi.
5. Uji pH semen dengan pH paper BTB atau MR, pH normal semen : 6,2–6,8

D. Persiapan Pemeriksaan Mikroskop

1. Siapkan pembesaran 200–400 kali pada mikroskop;
2. Atur suhu pada *slide warmer* pada suhu 37–38°C;
3. Siapkan monitor TV;
4. Siapkan seluruh bahan dan alat yang sudah disterilisasi : semen *examination plate* atau *object glasss*, *cover glass*, batang pengaduk kaca (*glass stick*), kapas beralkohol 70%, kasa steril, kertas tissue.

E. Prosedur pemeriksaan dengan mikroskop

1. Ambil semen dengan batang pengaduk (*glass stick*);
2. Teteskan sampel semen pada *examination plate* (*object glass*) yang sudah dihangatkan di atas *slide warmer;*
3. Tutup dengan *cover glass* dengan suhu yang sama;
4. Amati dengan menggunakan mikroskop dan di layar televisi/ monitor. Amati pada seluruh bidang pandang;
5. Amati persentase sperma yang hidup dan motilitasnya (penentuan persentase motilitas progresif dinilai secara ......)
6. Catat hasil pengamatan;
7. Setelah selesai pengamatan
   - Lakukan persiapan untuk pengamatan selanjutnya;
   - Ambil *cover glass* dari semen *examination plate object glass;*
   - Bersihkan semen *examination plate* dengan kapas beralkohol dan kasa steril;
   - Hangatkan semen *examination plate* pada *slide warmer;*
   - Batang pengaduk kaca, *cover glass*, dan alat-alat lainnya diganti setiap 1 kali pengamatan.

F. Hal – hal yang diamati dalam pemeriksaan

1. Presentase spermatozoa yang motil minimal 70% +++ - ++
2. Spermatozoa yang abnormal harus kurang dari 10%

3. Hal-hal lain yang diamati : ada / tidaknya nanah / darah putih, sampah atau debu lain yang disebabkan karena adanya iritasi atau inflamasi dan adanya sel-sel, semen ini harus dibuang
4. Catat data hasil pemeriksaan lalu masukkan data kedalam komputer.

5.4. Uji Biokimia

Uji biokimia adalah digunakan untuk mengamati penyebab-penyebab kematian spermatozoa atau berfungsinya organ reproduksi, misalnya :

1. Kandungan Fruktosa sebagai indikator berfungsinya kelenjar vesiculaseminalis, karena Fruktosa di produksi oleh kelenjar vesicula seminalis.
2. Kandungan Mineral sebagai indikator berfungsinya kelenjar prostata.
3. Kandungan *Glyseril Phosporil Cholin* sebagai indikator berfungsinya epididimis.

Selain itu biokemis juga dapat digunakan sebagai indikator kondisi seminal plasma atau pengencer, sehingga berpengaruh terhadap proses metabolisme spermatozoa, yaitu pH atau keasaman. hal ini karena spermatozoa dapat melakukan metabolisme yang normal apabila pada pH normal, apabila terlalu asam atau terlalu basa akan menyebabkan toxic dan metabolisme tidak bisa berjalan dengan baik.

5.5 Uji Biologis

Uji biologis adalah uji untuk melihat kandungan mikroba didalam semen. Uji biologis ini tidak dilakukan secara rutin, akan tetapi dilakukan secara berkala atau apabila saat pengalatan mikroskopis dijumpai banyak mikroba.

Uji biologis dilakukan dengan cara kultur mikroba dan apabila melebihi dari jumlah yang ditentukan maka pejantan nya harus dilakukan pengobatan dan sterilisasi peralatan perlu ditingkatkan.

BAB VI
Pengencer dan Sistem Pengenceran Semen

6.1. Pengencer semen dan fungsinya

Pengenceran adalah proses lanjutan dalam pembuatan semen beku yaitu dengan menambahkan bahan-bahan yang menunjang hidup semen selama dibekukan. Pengenceran semen dilakukan, karena volume semen sapi berkisar 4–8 ml, sedangkan inseminasi menggunakan volume 0,25 ml, sehingga semen yang dihasilkan dalam satu ejakulat dapat digunakan untuk menginseminasi sejumlah hewan betina yang sedang berahi. Pada proses pengenceran semen ini dibutuhkan pengencer yang dapat menjamin terjadinya proses metabolisme dan respirasi spermatozoa selama proses pendinginan, pencetakan ke dalam *straw* ataupun selama pembekuan. Oleh sebab itu pengencer yang digunakan harus berfungsi:

1. Nutrisi sebagai sumber energi, sehingga pengencer perlu mengandung gula sederhana misalnya glukosa, fruktosa, levulosa, raffinosa;
2. Perlindungan terhadap efek bahaya pendinginan yang cepat (*Cold Shock);*
3. Buffer untuk menyanggah agar pengencer pada pH netral (mendekati 7) karena spermatozoa akan mati pada kondisi asam atau basa;
4. Bersifat isotonis, agar tekanan osmose di pengencer sama dengan di dalam spermatozoa. Karena bila hipertonis, maka cairan didalam spermatozoa akan keluar, demikian juga sebaliknya bila terlalu encer (hipotonik) maka cairan dalam pengencer akan masuk ke dalam spermatozoa;
5. Penghambat pertumbuhan bakteri;

6. Volume semen bertambah, sehingga dapat untuk mengawini banyak betina;
7. Perlindungan sel *spermatozoa* selama pembekuan (*freezing*) yaitu krioprotektan. Pada saat pendinginan dibutuhkan ekstra seluler krioprotektan berupa gula sederhana sedangkan untuk pembekuan dibutuhkan intraseluler krioprotektan.

Pengencer mengandung bahan-bahan seperti bahan karbohidrat sebagai glukosa biasanya ditambahkan sebagai sumber energi untuk *spermatozoa*. Kuning telur dan susu digunakan untuk melindungi terhadap *cold shock* pada sel *spermatozoa* dengan temperatur suhu 5°C. Substansi ini juga mengandung nutrisi beberapa *buffer* digunakan untuk memelihara pH agar tetap normal dan tekanan osmotik. Untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme digunakan *penicilin* dan *streptomicyn.* Semen yang didapat saat penampungan setelah memenuhi kualitasnya dilakukan pengenceran agar di dapat semen beku yang banyak.

Terdapat 2 alasan pokok semen perlu diencerkan sebelum pembekuan yaitu : 1) alasan teknis dan 2) alasan biologis. Alasan teknis adalah untuk dapat menginseminasi lebih banyak betina dari semen pejantan unggul, sedangkan alasan biologisnya agar dapat memberikan medium yang cocok sebagai sumber nutrisi, control pH serta mempertahankan tekanan osmotik spermatozoa.

Selain persyaratan diatas yang harus dimiliki oleh setiap pengencer adalah (1) mempunyai daya preservasi tinggi, (2) mengandung unsur yang sifat fisik dan kimiawinya hampir sama dengan semen dan tidak mengandung zat yang bersifat racun bagi spermatozoa dan saluran kelamin betina, (3) tetap dapat mempertahankan daya fertilisasi spermatozoa, tidak terlalu kental sehingga menghambat fertilisasi.

Beberapa tambahan persyaratan yang lain adalah

1. Mudah membuatnya;
2. Tidak menghalangi saat uji kualitas;
3. Harganya terjangkau.

Bahan-bahan dan peralatan yang dipergunakan untuk media pengenceran semen harus terhindar dari bahan-bahan yang mematikan spermatozoa. Pengencer yang dibuat harus antiseptik dan disimpan di suhu dingin atau refrigerator, akan tetapi tidak dalam kondisi beku. Bahan-bahan yang ada di pengencer (extender) adalah gula sederhana (misal glukosa, laktosa atau rafinosa) ditambahkan sebagai sumber energi dari spermatozoa. Kuning telur dan *skim milk* digunakan untuk melindungi dari *cold shock*. Pada saat pendinginan dari suhu tubuh sampai dengan 5°C, subtansi tersebut juga sebagai nutrisi spermatozoa. Bermacam-macam bahan yang digunakan sebagai buffer sehingga pH mendekati netral dan tekanan osmose sekitar 300 mMol yang equivalen (sama) dengan semen, plasma darah dan susu, sedangkan untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme di dalam semen ditambahkan penisilin, streptomisin, polymyxin –B atau kombinasi lain antibiotik.

Semen sapi biasa digunakan pengencer larutan kuning telur, *homogenized whole milk*, susu segar, *skim milk* dan santan (*coconut milk*) dan larutan laktose, semen juga telah dapat dibekukan dengan buffer organik yaitu *tris hydroximethyl amino methan*.

Larutan buffer fosfat atau 3,2%, 2,9 *trisodium citrate dihydrate* pada pH 6,9 ditambahkan asam sitrat dikombinasikan dengan kuning telur , sebetulnya tidak perlu ditambahkan asam sitrat sebab komposisi kuning telur (20% dari volume) cukup kapasitasinya sebagai buffer agar pH menjadi netral.

Tujuan utama membuat semen beku yang baik adalah meningkatkan keberhasilan kebuntingan yang sama dengan kawin alam. Banyak faktor yang mempengaruhinya untuk menuju ke tujuan tersebut. Semen ternak sudah dapat dibekukan 30 tahun yang lalu. Teknik pembekuan secara terus menerus dimodifikasi dan diperbaiki hingga sekarang. Pembekuan semen diawali dengan menggunakan CO_2 cair (-79°C, kemudian diganti dengan N_2 cair (-196°C) karena kondisinya lebih stabil pada semen beku. Prosedur *cryopreservasi* pada semen sapi

keberhasilannya lebih tinggi dibandingkan pada ternak atau hewan yang lainnya.

Kemampuan hidup semen beku (*Freezability*) pada semen beku setelah *thawing* bervariasi antar spesies dan individu jantan dalam spesies yang sama. Variasi dalam spesies dan individu berhubungan dengan biofisika dan biokimia dari karakter membran spermatozoa. Fungsi integritas pada semen setelah *thawing* dari pembekuan dapat dievaluasi dengan kemampuan memvertilisasi ovum dan bertahannya didalam embriogenesis.

Kemampuan hidup spermatozoa setelah diejakulasikan didalam media seminal plasma hanya dapat bertahan dalam waktu yang pendek. Spermatozoa dapat hidup lama pada suhu dingin atau dibekukan membutuhkan media pelindung. Setiap pengencer yang berbeda mempunyai kemampuan untuk mempertahankan semen dengan formulasi yang berbeda.

Kallikrein dan kafein dapat menstimulasi motilitas spermatozoa dengan ditambahkan setelah semen beku di *thawing*. Kerja kafein adalah *menstimulasi ciclic adenosine monophosphate* (cAMP) di dalam spermatozoa dengan penambahan ini kemungkinan dapat membedakan selama transport dari saluran reproduksi betina.

Gliserol ditambahkan sebagai bahan yang melindungi spermatozoa dari efek pembekuan. Dimethylsulfoxide (DMSO) dan gula yaitu laktosa dan rafinosa juga baik dan semua bahan tersebut bersifat degidrasi atau menyerap air.

Dalam praktiknya, pengencer untuk pengenceran atau pembekuan semen menggunakan kuning telur atau susu yang dipanaskan atau kombinasi keduanya, kuning telur secara mudah juga dapat dikombinasikan dengan sodium sitrat atau buffer organik dan susu yang dipanaskan atau *skim milk*, dapat digunakan secara luas pada sapi dan dengan modifikasinya untuk semen domba, kambing, babi dan kuda.

Tabel 6.1 Jumlah *straw* yang dihasilkan, penyimpanan dan hasil IB dengan menggunakan semen beku dalam kondisi rata-rata (Hafez, 2008 b)

Parameter	Semen beku				
	sapi	domba	kambing	babi	kuda
Jumlah yang didapat pada 1 ml semen (ml)	10-75	5-10	10-25	4	2
Dosis Inseminasi Volume (ml)	0,2-1	0,05-0,2	0,5	50	20-50
Spermatozoa motil (10^6)	15	200	20	5000	1500
Waktu terbaik untuk IB selama estrus	9 jam setelah akhir estrus	10-12 setelah tanda estrus	12-36 jam setelah tanda estrus	15-30 jam setelah tanda estrus	Hari kedua, dimulai hari ke 2 pada estrus
Posisi deposisi semen	Uterus atau servik	Uterus jika mungkin	Uterus jika mungkin	Servik ke dalam uterus	uterus
Jumlah kemampuan pejantan Per ejakulasi Per minggu	300 1000	15 150	15 150	10 30	5 15

Berbagai macam pengencer yang sering digunakan :

1. Pengencer Tris Aminomethan Kuning telur

Bahan yang dapat digunakan sebagai media pengencer antara lain Tris aminomethan kuning telur. Pengencer ini memiliki bahan atau zat yang diperlukan oleh spermatozoa yang merupakan sumber makanan baginya, antara lain yaitu seperti fruktosa, laktosa, rafinosa, asam-asam amino dan vitamin dalam kuning telur sehingga spermatozoa dapat memperoleh sumber energi dalam jumlah yang cukup untuk motilitasnya.

Pengencer Tris aminomethan kuning telur terdiri dari tris aminomethan, asam sitrat, laktosa/levulosa, fruktosa, raffinosa, penicillin dan streptomycin. Fungsi dari masing-masing bahan tersebut adalah:

1. Tris aminometahn kuning telur : sebagai buffer untuk mencegah perubahan pH akibat metabolisme spermatozoa berupa asam laktat dan mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit;
2. Asam sitrat : sebagai buffer pengikat butir-butir lemak kuning telur dan mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit;
3. Laktosa/levulosa : sebagai sumber energi spermatozoa;
4. Kuning telur : sebagai pelindung spermatozoa terhadap *cold shock* dan sumber energi spermatozoa;
5. Raffinosa : sebagai sumber energi dan mencegah efek lethal pembekuan;
6. Penicilin streptomycin : mencegah pertumbuhan mikroorganisme dan meningkatkan daya tahan spermatozoa (Susilawati, 2000).

Khasiat kuning telur terletak pada lipoprotein dan lechitin yang terkandung di dalamnya yang bekerja mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein dari sel spermatozoa. Kuning telur juga mengandung glukosa, yang lebih baik digunakan oleh spermatozoa sapi untuk metabolismenya daripada fruktosa yang terdapat di dalam semen, berbagai protein, vitamin-vitamin yang larut dalam air maupun yang larut dalam minyak, dan memiliki viskositas yang mungkin menguntungkan spermatozoa. Kuning telur mengandung asam-asam amino L-tyrosin, L-tryptophan, dan L-phenilalanin yang menghasilkan hydrogen peroksida pada deaminasi oksiatif. Kuning telur juga mengandung bahan diantaranya lipoprotein dan lechitin yang berfungsi melindungi spermatozoa terhadap *cold shock*, karena kemampuannya mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein dari membran sel spermatozoa.

Pembuatan Pengencer Tris aminomethan kuning telur

Tabel 6.2. Komposisi Kimia Pengencer Tris Amino Methan dalam 100

Bahan Penyusun	Jumlah
Tris Amino Methan	1.363 g
Citric Acid/asam sitrat	0.762 g
Lactose	1.500 g
Fructose	0.500 g
Kuning telur	20.00 ml
Raffinose	2.700 g
Streptomycin	0.100 g
Aquadest	80.00 ml
Penicillin	0.100 g

Cara pembuatan pengencer *Tris Amino Methan* adalah sebagai berikut:

- Bahan-bahan yang terdiri dari Tris aminomethan, asam sitrat, laktosa, raffinosa dan fruktosa dimasukkan dalam Erlenmeyer dan ditambahkan aquadest 80 ml serta dihomogenkan dengan magnetik stirer selama 10-15 menit;
- Setelah dihomogenkan kemudian dimasukkan ke dalam panci dan dipanaskan sampai mendidih dengan tujuan untuk sterilisasi;
- Diturunkan suhunya dari 100 ^{0}C ke 37^{0}C;
- Ditambahkan penicillin dan streptomycin dan dihogenkan lagi selama 10–15 menit;
- Dimasukkan dalam refrigerator dan setelah 3 hari dipisahkan antara endapan dan supernatan serta yang digunakan hanya supernatannya sedangkan endapan dibuang.

Tabel 6.3. Tris fruktose kuning telur pengencer untuk domba

Komponen	Jumlah
Tris (hydroxymethyl) aminomethan	3.634 g
Fruktosa	0.50 g
Kuning telur	14 ml
Aquades	Dibuat sampai 100 ml

(Ax *et al*, 2008)

2. AndroMed®

AndroMed® merupakan suatu medium tanpa kuning telur untuk semen beku dan cair yang mempunyai angka fertilitas tinggi walaupun tanpa kandungan dari hewan aslinya. Selain itu juga tidak mempunyai resiko kontaminasi mikroorganisme serta mudah dalam penanganan dan waktu penyimpanan. Bahan pengencer instan ini berupa cairan tersusun atas aquabidest, fruktose, glyserol, asam sitrat, buffer, phosfolipid, spectynomycine, lincomycine 15 mg, tylocin 5 mg, gentamycine 25 mg. AndroMed® adalah pengencer alternatif baru, hasilnya lebih baik jika dibandingkan dengan pengencer tris kuning telur. Selain itu AndroMed® bisa menghasilkan motilitas dan ketahanan spermatozoa yang lebih baik daripada media tris kuning telur. AndroMed® berisi bukan protein hewani seperti protein kuning telur, motilitas progresif post *thawing* AndroMed® juga lebih baik dari Triladyl™.

Salah satu komposisi AndroMed® adalah gliserol. Gliserol merupakan krioprotektan intraseluler yang memiliki berat molekul 92,10 kd, rumus kimia $C_3H_5(OH)_3$ dan berat jenis 1,25 g/cm^3 pada suhu 20^{0}C (Garner dan Hafez, 2008). Gliserol adalah suatu zat yang dapat berdifusi ke dalam sel-sel spermatozoa dan dapat dimetabolisir dalam proses-proses yang menghasilkan energi dan membentuk fruktos. Jadi dalam keadaan aerob, gliserol berfungsi sebagai penghasil fruktosa; lebih sedikit asam laktat yang terbentuk tetapi spermatozoa menunjukkan aktivitas yang optimum (Toelihere, 1985).

Peranan gliserol sebagai bahan krioprotektan dalam alur mekanisme reaksi preservasi sel adalah sebagai penurunan titik beku medium krioprotektan, perlindungan terhadap membran sel, menekan laju pengaruh peningkatan konsentrasi, serta merubah bentuk dan ukuran kristal es. Disamping perlunya penambahan gliserol dalam pengencer, juga dibutuhkan penambahan antibiotik. Antibiotik ini berfungsi untuk mengeleminasi organisme *Vibrio foetus* serta akan meninggikan daya tahan hidup spermatozoa. Gliserol dengan pengencer

seharusnya dimasukkan ke dalam semen yang telah bercampur pengencer tanpa gliserol setelah didinginkan mencapai suhu 5°C tidak lebih dari 2 jam (Anonymous, 2001).

Pembuatan pengencer AndroMed® :

1. Dimasukkan dalam gelas ukur 50 ml;
2. Ditambahkan aquabidest dengan perbandingan antara AndroMed® dan Aquabidest = 1 : 4, lalu dihomogenkan;
3. Dimasukkan dalam wadah *waterbath* dengan suhu 38°C;
4. Siap untuk digunakan sebagai pengencer semen.

3. Pengencer TCM 199 Kuning Telur

TCM 199 adalah sebutan dari *Tissue Culture Medium* 199 adalah media yang biasa digunakan untuk *Culture sel* atau embrio, produk dari Sigma Medium ini mengandung bahan-bahan yang lengkap untuk kebutuhan hidup sel.

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan hasilnya menunjukkan bahwa TCM 199 kuning telur lebih baik daripada Tris aminomethan kuning telur. Medium pengencer TCM 199 kuning telur ini adalah merupakan hasil pemcampuran dari : 1). TCM 199 produk dari Sigma 2). Serum dan 3). Kuning Telur. Sedangkan Cara Pembuatannya adalah sebagai berikut:

1. TCM 199

TCM 199 adalah produk dari Sigma yang berupa cairan atau dalam bentuk *powder*. Perbedaan harganya sangat besar sehingga disarankan menggunakan yang dalam bentuk *powder* yang lebih murah.

Satu sachet TCM 199 dapat untuk 1000 ml larutan, oleh karena cairan ini banyak kandungan nutrisinya maka cenderung mudah kontaminasi, oleh sebabnya sebaiknya pembuatan larutan disesuaikan dengan kebutuhan.

Cara Pembuatan :

1. Misalnya yang dibutuhkan 100 ml maka ambil seper sepuluhnya dengan cara ditimbang dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer;

2. Tambahkan aquabides sebanyak 100 ml, mala larutan akan berwarna kuning yang menandakan pH sekitar 6;
3. Tambahkan NaH_2PO_4 atau NaH_2CO_3 sedikit demi sedikit hingga warna menjadi oranye, sehingga pH menjadi sekitar 7.

2. Serum

Serum dapat berasal dari produk perusahaan misalnya Fetal Bove atau serum produk dari Sigma, akan tetapi harganya mahal, maka dapat diganti dengan serum buatan sendiri, cara pembuatannya adalah sebagai berikut:

1. Ambil darah sapi atau kambing dari ternak yang sehat, dengan tabung venoject yang telah berisi EDTA. Hindari guncangan dan suhu panas, sehingga segera tabung dimasukkan dalam termos yang telah berisi es batu dan hindari banyak goncangan;
2. Sentrifugasi 3000 Rpm selama 20 menit;
3. Ambil serum (cairan yang bening) dengan menggunakan pipet pasteur secara hati-hati, jangan sampai tercampur darah merahnya;
4. Setelah jumlahnya telah terkumpul banyak, maka dilakukan *in activasi.* Proses *in activasi* ini gunanya agar kerja enzim-enzim tidak aktif, sehingga tidak berpengaruh terhadap spermatozoa, karena yang diambil hanya bahan-bahan yang terkandung dalam serum;
5. Cara *in activasi* adalah : Masukkan erlenmeyer yang telah berisi serum ke dalam air dengan suhu sekitar 58°C selama 20 menit, selanjutnya simpan di *freezer* dalam tabung kecil-kecil, sehingga dapat di *thawing* sesuai dengan kebutuhan.

3. Kuning Telur

Kuning telur yang sering digunakan sebagai ekstraseluler krioprotektan adalah kuning telur ayam ras dengan umur kurang dari 3 hari,sedangkan telur ayam buras, dan itik juga tepat dapat digunakan asalkan umur telur kurang dari 3 hari agar kualitasnya masih baik.

Cara pencampuran medium :

1. Siapkan larutkan TCM 199 dengan pH netral sekitar 7;
2. Tambahkan serum 4–10 % dari cairannya;
3. Ambil cairan sebanyak 4% dan dibuang, diganti dengan kuning telur ayam sebanyak 4% kemudian dihomogenisasi.
4. Setelah homogen, maka pengencer siap digunakan;
5. Apabila akan digunakan pembekuan, sistem pencampuran Gliserol sama dengan pembuatan medium B pada tris amino methan kuning telur.

6.2. Pengencer semen alternatif.

Pengencer semen alternatif yang dimaksudkan adalah pengencer semen dengan menggunaan bahan-bahan yang ada di lingkungan sekitarnya, misalnya pemanfaatan air kelapa atau air garam fisiologis, banyak sekali penelitian yang menggunakan produk tanaman akan tetapi hanya berupa penelitian yang hingga saat ini belum ada yang diaplikasikan. Misalnya menggunakan sari buah (pisang, alpukat, tomat, wortel dll), susu, kuning telur itik, entok, dan madu. Di dalam perkembangan pengetahuan tentang pengencer alternatif, diupayakan tidak menggunakan produk dari hewan akan tetapi bahan-bahan dari tanaman

Berdasarkan kebutuhan spermatozoa hidup dengan mengunakan medium yang sesuai untuk kehidupannya dan juga geraknya, maka di dalam membuat pengecer perlu diperhitungkan kedua macam fungsi tersebut, selain itu juga daya simpan dari pengencer tersebut dan yang paling penting adalah diketahuinya bahan aktif yang terkandung di dalam bahan tersebut, sedangkan yang tak kalah pentingnya terdapatnya bahan ikutan yang bersifat *toxic*.

Beberapa tahun ini direkomendasikan IB dengan menggunakan semen air (tidak beku) dan beberapa pengencer telah direkomendasikan. Pengencer yang paling banyak digunakan pada sapi adalah kuning telur dengan Na Sitrat atau Tris, atau susu yang dipanaskan, pengencer ini juga dapat digunakan oleh spesies lain. Bila untuk semen beku tinggal menambahkan gliserol, akan tetapi hasil IB menggunakan semen beku tidak pernah lebih baik dari semen cair, sebab beberapa spermatozoa akan mati setelah dilakukan pembekuan.

Semen yang disimpan dalam suhu sedang (ambien) dapat digunakan kuning telur + karbonat yang disebut dengan pengencer Illinois Variabel Temperatur (IVT) atau santan (*coconut milk*) memberikan fertilitas yang memuaskan sehingga semen dapat disimpan beberapa hari pada suhu sedang (Hafez, 2008 b). Semua sapi dapat di IB dengan semen beku yang telah disimpan lama dalam suhu -196°C dalam keadaan terendam nitrogen cair.

Semen sapi dalam bentuk pelet yang dibekukan dalam CO_2 padat (*dry ice*) telah digunakan di beberapa negara, di dalam pengencer digunakan gula rafinosa atau 11% laktosa. Penggunakan pelet adalah suatu teknik penyimpanan yang tidak mahal, tetapi sangat sulit untuk diaplikasikan bila dengan menggunakan pejantan yang banyak teutama dalam hal identifikasinya.

Semen beberapa spesies sulit dibekukan dalam bentuk pelet, akan tetapi semen kambing berhasil dibekukan dengan menggunakan *skim milk* dengan 9 gram glukosa per liter dan 7% gliserol dari semua volume. Kadar gliserol yang tinggi dapat menurunkan fertilitas semen babi, sehingga hanya diberikan 2 % atau lebih kecil dari 2% dalam pengencer dan semen beku babi telah berhasil dikomersialkan (Hafez, 2008b).

Semen kuda juga dapat dibekukan dalam bentuk pelet atau semen beku. Pengencer kuning telur- tris cream-gelatin dapat digunakan sebagai pengencer, penambahan gliserol akan menurunkan fertilitas semen kuda dan beberapa semen kuda kualitas semen bekunya akan rendah karena belum ada metode yang baku, walaupun saat ini IB pada kuda telah berhasil dilakukan.

6.2.1. Pengenceran

Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari menggunakan dua macam pengencer, yaitu pengencer *trisaminomethane* dan *skim milk*, tetapi penggunaanya tergantung pada motilitas *spermatozoa* dan pengencer *trisaminomethane* yang sering digunakan di BBIB Singosari. Bahan-bahan dan cara pembuatan pengencer *trisaminomethane* di BBIB Singosari sebagai berikut:

Bahan-bahan :

1. *Trisaminomethane* : 1,6 %
2. *Asam sitrat* : 0,9 %
3. *Laktose* : 1,4 %
4. *Rafinose* : 2,5 %
5. *Levulose* : 80,0 %
6. Antibiotik (*penicillin dan streptomycin*) : 100 cc
7. Kuning telur : 20,0 %
8. *Aquades*

Tabel 6.4. Komposisi kimia pengencer *trisaminomethan* dalam 1000 ml tanpa *glycerol* 13%.

BAHAN	JUMLAH
Tris Amino Methane	13.63 g
Citric Acid	7.62 g
Lactose	15.00 g
Fructose	3.75 g
Lipoprotein	200.00 g
Raffinose	27.00 g
Streptomycin	1.00 g
Aquadest	755.00 g
Penicillin	1 juta IU

Sumber: Data primer BBIB Singosari (2011)

Jumlah kadar pengencer tergantung pada volume ejakulasi, konsentrasi dan persentase *spermatozoa* yang hidup dan motil progresif, sehingga perhitungan penentuan kebutuhan pengencer konsentrasi ejakulat dikalikan dengan persentase *spermatozoa* hidup dan bergerak progresif.

Perhitungan Penambahan Volume Pengencer

A. Perhitungan Volume Total

V. Total (ml) = $\frac{\text{Volume Semen (ml) x } (\textit{spermatozoa}) \text{ . } 10^6}{25 \text{ . } 10^6 \text{ . } 1/0{,}25}$

B. Perhitungan Volume Larutan Pengencer A1 yang Ditambahkan

Volume A1 = Volume Semen ; 1 : 1

C. Perhitungan Volume Larutan Pengencer A2 yang Ditambahkan

V. Larutan pengencer A2 yang ditambahkan (ml) =

$$\frac{\text{V. Total (ml)} - (\text{V. A1} + \text{V. Semen})}{2}$$

D. Perhitungan Volume Larutan Pengencer B yang Ditambahkan

V. larutan pengencer B yang ditambahkan (ml) =

$$\frac{\text{V. Total (ml)}}{2}$$

E. Perhitungan Dosis atau Jumlah *Straw* yang Digunakan

$$\text{Dosis} = \frac{\text{V. Total (ml)}}{0{,}25 \text{ ml}}$$

Cara pembuatan pengencer *trisaminomethan* yang dilakukan di BBIB Singosari adalah sebagai berikut:

1. **Dilakukan sterilisasi pada tempat atau meja kerja dan jari-jari tangan dengan menggunakan alkohol 70 %;**
2. **Digunakan peralatan yang sudah didisinfeksi;**
3. **Persiapan pada bahan baku:**
   - Bahan-bahan yang akan digunakan dicek dan diletakkan di atas meja.
   - Bahan-bahan ditimbang dengan tepat.
4. **Persiapan telur**
   - Digunakan telur yang masih segar;
   - Telur dicuci lalu lakukan disinfeksi dengan menggunakan alkohol 70%;
   - Telur disimpan sebentar dalam lemari es dapat mempermudah pemisahan kuning telur dan putih telur;
   - Kuning telur dimasukkan ke dalam larutan yang sudah dipanaskan pada saat larutan bersuhu kurang dari 40°C.
5. **Pencampuran bahan dan telur**
   - *Trisaminomethan, asam sitrat, laktosa, fruktosa* dan *raffinosa* dimasukkan ke dalam gelas *Erlenmeyer* 100 ml. Kemudian

755 ml aquadest ditambahkan dan dihomogenkan;
- Gelas *Erlenmeyer* tersebut dimasukkan ke dalam panci berisi air dan dipanaskan sampai mendidih;
- *Erlenmeyer* diangkat dan dimasukkan ke dalam ruang ber AC;
- Jika suhu larutan telah mencapai 37°C antibiotik (*Streptomycin* dan *Penicilin*) dimasukkan dan dihomogenkan;
- Kuning telur yang mengandung *lipoprotein* dimasukkan dan dihomogenkan selama 15 menit.

6. **Penyimpanan**
    - Volume larutan yang besar memerlukan antibiotic yang lebih banyak yang disesuaikan dengan jumlah larutannya;
    - larutan dipindahkan ke dalam tabung ukur;
    - larutan disimpan di dalam *refrigerator* pada suhu 4–5°C, tutup tabung dengan *aluminium foil*;
    - Larutan yang sudah disimpan di dalam *refrigerator* selama sehari akan membentuk endapan (sedimen);
    - *Supernatant* yang dihasilkan digunakan sebagai larutan pengencer A;
    - Endapan yang dihasilkan dari larutan yang disimpan selama tiga hari akan menjadi lebih padat, sehingga *supernatant* lebih mudah diambil;
    - *Supernatant* yang sudah diambil (larutan pengencer A) dapat disimpan selama 2 minggu didalam *refrigerator*.
7. **Pembuatan pengencer B.**
    - Pengencer B adalah pengencer A yang sudah ditambah dengan 13% gliserol;
    - Buat pengencer B sehari sebelum digunakan (agar gliserol benar-benar terlarut dalam larutan A);
    - Di beri tanda pada masing-masing tabung berisi pengencer A dan pengencer B.

Sumber: Data primer BBIB Singosari (2011)

Pengenceran semen dilakukan dalam tiga tahap yaitu pada suhu 37°C, 12°C dan 5°C. Pengenceran yang dipakai dibagi dalam 2 bagian yaitu pengencer A (pengencer *trisaminomethan* tanpa glycerol 13%) dan pengencer B (pengencer *trisaminomethan* + glycerol 13%) dimana volume glycerol 13 % dari volume semen masing-masing individu. Pengencer A disiapkan dalam suhu 37°C dan diberikan dalam 2 tahap yaitu tahap pertama diberikan pada suhu semen 37°C dengan perbandingan 1 : 1 dan sisanya pengencer A2 diberikan pada suhu 12°C. Pengenceran B diberikan pada suhu 5°C dengan pengencer yang mengandung gliserol. Toelihere (1993) berpendapat bahwa proses gliserolisasi atau penuangan pengencer B dilakukan secara bertahap untuk mencegah terjadinya *osmotic shock* dan memberi kesempatan keseimbangan molekul sel-sel *spermatozoa* dengan pengencer yang mengandung gliserol.

PEMBUATAN LARUTAN PENGENCER

I. Egg Yolk Tris

1. Lakukan desinfeksi pada tempat/meja dan jari – jari tangan dengan menggunakan *alcohol* 70%;
2. Gunakan peralatan yang sudah disterilisasi;
3. Persiapan pada bahan baku
   - Cek bahan-bahan yang akan digunakan dan letakkan di atas meja. Jangan letakkan bahan-bahan yang tidak dipakai di atas meja;
   - Timbang bahan-bahan dengan tepat;
   - Jangan lakukan penimbangan bahan-bahan sekaligus;
   - Lakukan pencampuran dengan cepat, pencampuran yang lambat dapat menimbulkan reaksi kimia yang tidak diinginkan.
4. Persiapan telur
   - Telur tidak dapat disterilisasi;
   - Gunakan telur yang masih segar;
   - Cuci telur lalu lakukan disinfeksi dengan mengunakan alcohol 70%;
   - Telur disimpan sebentar dalam lemari es dapat

mempermudah pemisahan kuning telur dan putih telur;
- Masukkan kuning telur ke dalam larutan yang sudah dipanaskan pada saat larutan bersuhu kurang dari 40°C.

5. Penyimpanan
   - Volume larutan yang besar memerlukan antibiotic yang lebih banyak;
   - Pindah larutan ke dalam tabung ukur;
   - Simpan larutan di dalam lemari es pada suhu 4–5°C,tutup tabung dengan alumunium foil;
   - Larutan yang sudah disimpan di dalam lemari es selama sehari akan membentuk endapan (sedimen);
   - Supernatan yang sudah diambil (larutan pengencer A) dapat disimpan selama 2 minggu di dalam lemari es.
6. Pembuatan pengencer B
   - Pengencer B adalah pengencer A yang sudah ditambah dengan 13 % gliserin benar-benar terlarut dalam larutan A;
   - Buat pengencer B sehari sebelum digunakan (agar gliserin benar-benar terlarut dalam larutan A);
   - Beri tanda pada masing - masing tabung berisi pengencer A pengencer B.

II. SKIM MILK

1. Dasar pembuatan larutan pengencer skim sama dengan larutan pengencer TRIS;
2. Gunakan susu terhomogenisasi atau susu skim;
3. Panaskan susu skim selama 10 menit;
4. Untuk membuat larutan B,tambahkan 20% gliserin.

Komposisi Pengencer BIB Singosari

1. Egg Yolk Tris Dilution

A. (1 st Diluter)

Tris Amino Methane	±	1,5	%(g/g)
Citric Acid	±	0,9	% (g/g)
Lactose	±	1,4	%(g/g)
Raffinose	±	2,5	%(g/g)
Distilled Water	±	80,0	%(g/g)

Egg Yolk	±	20,0	%(v/v)
Penicilin	±	100.000,0	% IU/100ml
Streptomycin	±	0,1	g/100 ml

B. (2 st Diluter)

(A) + Glycein 13%

2. Skim Milk Dilution

A. (1st Dilluter)

Bahan :

Skim Milk	±	10	% (g/g)
Glucose	±	1	% (g/g)
Penicilin	±	100.000.0	% (g/g)
Streptomisin	±	0,1	% (g/100 ml)
Egg Yolk	±	5	% (v/v)
Distilled Water	±	80	% (v/v)

B. Dilution

A + 20% of Glycerin

8. Penambahan Larutan Pengencer

A. Perhitungan Jumlah Spermatozoa Motil setelah Thawing
   1. Hitung data menggunakan computer
   2. Perhitungan persentase spermatozoa motil setelah *thawing* minimal 40%
   3. Jumlah spermatozoa motil minimal 12.000.000 (1 *straw* berisi 30.000.000 sel)

B. Perhitungan Volume Total

$$\text{V.Total (ml)} = \frac{\text{(Vol.semen (ml) × konsentrasi spermatozoa (jt / ml)}}{\text{Konsentrasi spermatozoa pada 1 ml (cc)}}$$

C. Perhitungan jumlah Pengencer

$$\text{Jumlah Pengencer} = \frac{\text{Volume Total}}{\text{Volume total semen yang diperoleh}}$$

D. Perhitungan volume larutan pengencer A2 yang ditambahkan

$$\frac{\text{V.Total (ml)}}{2} - \sum \text{(V. Semen (ml) + V.larutan A1 (ml)}$$

V.Larutan Pengencer A2 yang ditambahkan =

E. Perhitungan volume larutan pengencer B yang ditambahkan

$$\frac{\text{V. Total ml)}}{2}$$

V. Larutan pengencer B yang ditambahkan (ml) =

F. Perhitungan dosis atau jumlah *straw* yang digunakan

$$\text{Dosis} = \frac{\text{V. Total (ml)}}{\text{0,25 ml}}$$

Contoh Perhitungan

1. Volume Total (Tabel 6.5.)

Penampungan ke -	Volume Semen (ml)	Konsentrasi Spermatozoa / ml	Total Konsentrasi Spermatozoa
1.	6,0	1.200.000.000	7.200.000.000
2.	4,0	1.000.000.000	4.000.000.000
Total	10,0		11.200.000.000

$$\text{Volume Total} = \frac{11.200.000.000}{30.000.000 \times 1/0,25} = 93,3 \text{ ml}$$

2. Jumlah Pengencer

   $$\text{Jumlah Pengencer} = \frac{93 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} = 9,3 \text{ kali}$$

3. Volume Larutan Pengencer A2 yang ditambahkan

   Larutan Pengencer A2 yang ditambahkan =

   93 ml/2 ml - (6 ml semen + 6 mll larutan A1) + (4ml + 4 ml larutan A1) = 26,5 2ml

4. Volume pengencer B yang ditambahkan

   $$\text{Larutan pengencer B yang ditambahkan} = \frac{93 \text{ ml}}{2} = 46,5 \text{ ml}$$

5. Banyaknya dosis yang akan digunakan

   $$\text{Dosis} = \frac{93 \text{ ml}}{0,25} = 372 \text{ ds}$$

9. Penambahan Pengencer A2 Pada Semen

A. Penambahan Pengencer A2

a. Penambahan pengencer A2 sesuai dengan perhitungan yang sudah dilakukan

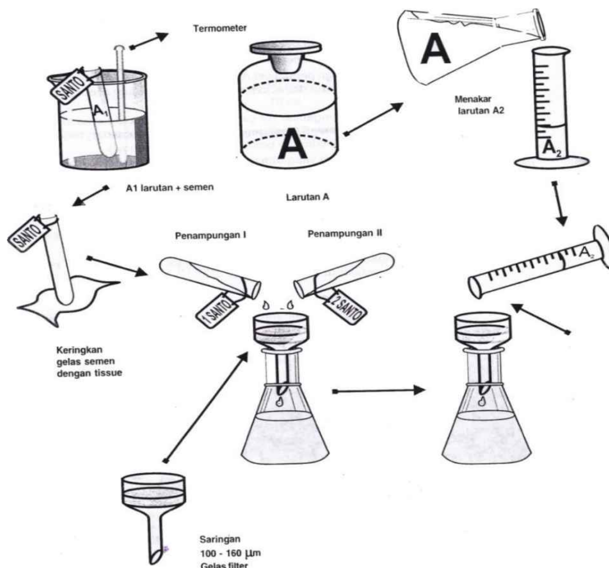
b. Persiapan alat dan bahan

- Yang bisa digunakan berulang – ulang : Tabung ukur,gelas ukur,handuk.
- Alat yang selalu pakai : Labu erlemenyer , glas filter
- Bahan : Larutan pengencer A

c. Saat penambahan pengencer A2,suhu larutan semen A1 harus 4 – 5 C (Suhu larutan yang tinggi dapat menyebabkan temeperature shock pada spermatozoa)

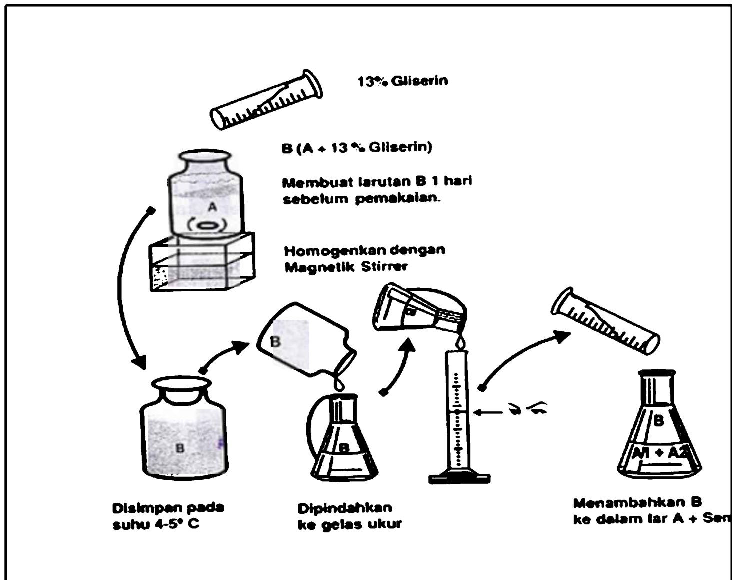
d. Suhu larutan pengencer A2 yang akan ditambahkan harus sama dengan suhu larutan semen + Pengencer A1 (Untuk menghindari terjadinya temperature shock)

e. Tabung/Peralatan yang digunakan harus steril dan kering, terutama pada bagian dalam tabung (Apabila terdapat air harus dikeringkan terlebih dahulu)

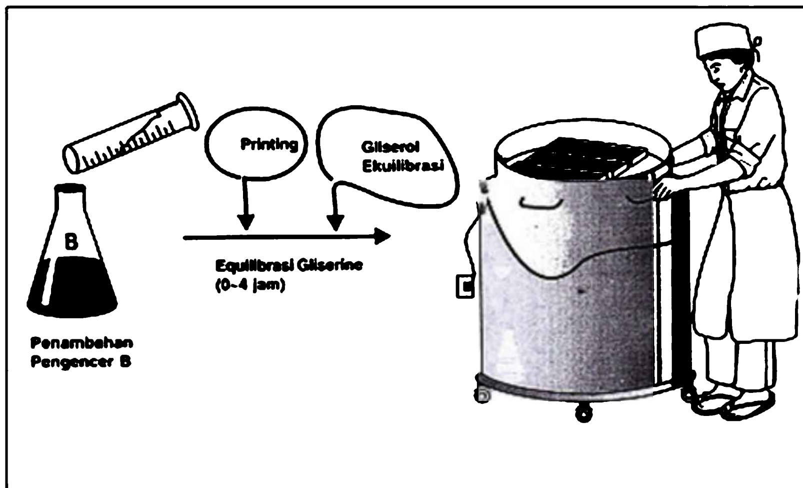


Gambar 6.1 pengenceran semen (Zenichiro dkk, 2002)

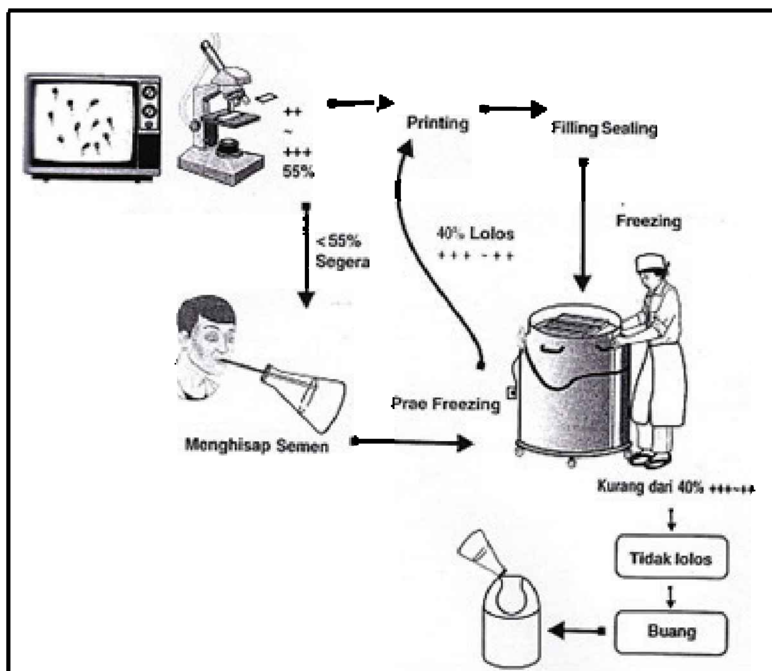
f Hindari tercampurannya semen yang ditampung dari pejantan yang berbeda dengan cara
- Campurkan semen yang ditampung dari pejantan yang sama (bila terdapat lebih dari satu ejakulasi)
- Jangan gunakan alat yang sama antara peralatan untuk pengencer dan peralatan untuk semen



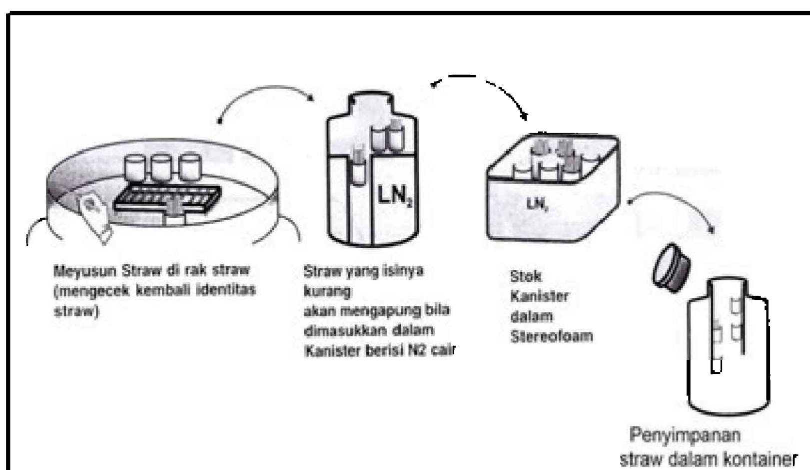
Gambar 6.2 Pengenceran dengan A2 (Zenichiro dkk, 2002)



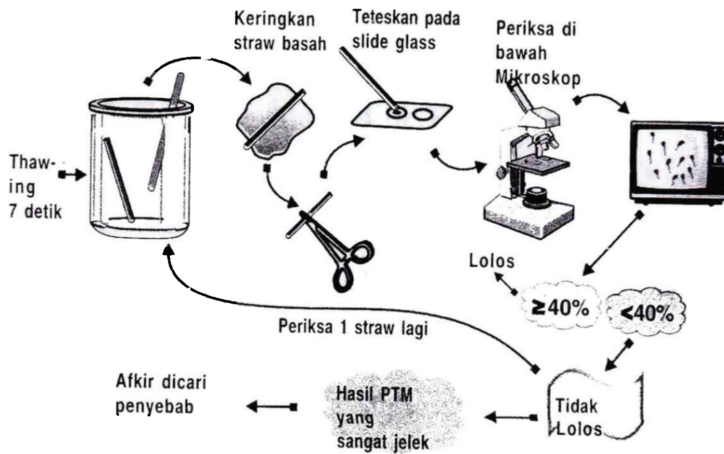
Gambar 6.3 Proses equilibrasi (Zenichiro dkk, 2002)



Gambar 6.4 Beberapa tahan uji kualitas semen (Zenichiro dkk, 2002)



Gambar 6.5 Proses pre freezing dan freezing (Zenichiro dkk, 2002)



Gambar 6.6 Uji kualitas post *thawing* motility (Zenichiro dkk, 2002)

10. Penyimpanan Larutan Semen + Pengencer

A. Penyimpanan

a. Sistem ini diambil dari Masuda sistem (Japan,May,1991)
b. Simpan larutan semen + pengencer A pada suhu 4 -5 C
c. Penyimpanan dilakukan selama 18 -24 jam (pembekuan dilakukan keesokkan harinya)
d. Selama penyimpanan , temperature tempat penyimpanan harus konstan. Untuk mencegah naiknya temperature ruang penyimpanan,dilakukan dengan cara :
   - Rendam tabung berisi semen + pengencer A didalam gelas berisi air dingin) $ C) lalu simpan dalam lemari es
   - Masukkan tabung berisi larutan semen + pengencer ke dalam sterefoam lalu simpan di dalam lemari es

Beberapa Peningkatan dari Penerapan Sistem Masuda (Mei 1991 Jepang)

1. Dengan sistem atau metode baru daya hidup sel spermatozoa setelah pembekuan meningkat 10–15% dibanding sistem atau metode lama (setelah penambahan pengencer A disimpan pada suhu 4–5°C selama 18-24 jam)

2. Hari berikutnya dilanjutkan proses pembekuan dan melaksanakan proses penampungan pada sapi pejantan yang berbeda sesuai jadwal
3. Hal tersebut memungkinkan petugas mengecek atau memeriksa kualitas semen beku dengan lebih baik
4. Temperatur dapat dikontrol dengan benar selama proses pembekuan
5. Dapat melakukan penampungan semen dan memproduksi semen beku dalam jumlah besar, metode ini akan sangat membantu
6. Bila ada masalah mekanis dan yang lain dapat diatur penyelesaiannya
7. Petugas yang melaksanakan distribusi semen beku dapat melaksanakan sesuai rencana
8. Seluruh pekerjaan di Laboratorium berjalan lebih efektif dan efisien
9. Petugas Laboratorium yang beragama Islam dapat menunaikan ibadahnya, (saat ramadhan tidak usah lembur dan dapat melaksanakan sholat jum'at)
10. Dengan 1 kali penambahan lar pengencer B : tidak perlu menggunakan peralatan yang mahal (Agitator), besar (Cool Top), Pelaksanaanya sangat mudah tidak memakan waktu (hanya sebentar)

11. Penambahan Larutan Pengencer B (Larutan Pengenceran + 13 % Gliserin)

A. Penambahan Larutan Pengencer B

1. Penambahan larutan pengencer B dilakukan sekaligus
2. Volume larutan pengencer B yang ditambahkan sebanyak ½ dari volume total
3. Gliserin akan larut dengan sempurna (menjadi homogeny) dengan larutan A jika ditambahkan dan dihomogenkan satu hari sebelum pemakaian (buat larutan B satu hari sebelum pemakaian)
4. Suhu larutan pengencer B yang akan ditambahkan harus sama dengan larutan B pengencer A + Semen (4 -5 C)

5. Jangan menyentuh tabung berisi larutan pengencer B dengan tabung yang berisi larutan pengencer A + Semen

B. Alasan Penambahan Larutan Pengencer B yang Dilakukan Sekaligus

1. Terdapat laporan penelitian yang menyatakan bahwa larutan pengencer B dapat ditambahkan sekaligus
2. Tidak perlu menggunakan peralatan yang mahal (agitator)
3. Penerapannya sangat mudah karena dapat dituang sekaligus (dengan satu kali penambahan : pekerjaan mudah dilakukan , waktunya lebih pendek ,dan tidak perlu menggunakan peralatan yang preparasi dan penanganannya rumit)
4. Resiko untuk terkontaminasi (bakteri, Virus) atau tercampur dengan semen lain kecil

C. Equilibrasi Gliserin

1. Pada dasarnya tidak perlu dilakukan equilibrasi gliserin
2. Terdapat tenggang waktu dari saat penambahan larutan B sampai dengan pembekuan , sehingga dapat dikatakan telah terjadi equilibrasi
3. Equilibrasi gliserin tidak boleh terlalu lama karena dapat merusak spermatozoa

D. Pemeriksaan Konsentrasi Spermatozoa & Motilitas Sebelum Freezing

1. Batas minimal motilitas sperma sebelum dilakukan *freezing* : 55% +++ - ++
2. Motilitas spermatozoa yang kurang dari 55% +++ - ++ harus dibuang
3. Untuk semen dari pejantan favorit/penting dan banyak dibutuhkan : Apabila konsentrasi dan motilitas kurang dari 55% +++ - ++, segera lakukan *pre–freezing* dan *freezing* kemudian lakukan *thawing* dan lakukan uji PTM untuk menentukkan bisa digunakan atau tidak.

BAB VII
Pendinginan dan Pembekuan Semen

Cooling adalah proses pendinginan semen setelah diencerkan, dimasukkan dalam gelas ukur tertutup dan ditempatkan pada beaker glass berisi air dengan suhu 37°C kemudian diletakkan di dalam alat pendingin *(cool top)* (Bearden dan Fuquay, 1984 dan Hafez, 2008b). *Cooling* harus berjalan secara perlahan dan minimal 1 jam untuk menurunkan suhu semen dari 37°C menjadi 5°C dan semen harus direndam air untuk mencegah *cold shock*. Proses pendinginan menyebabkan stress fisik dan kimia pada membran spermatozoa yang dapat menurunkan viabilitas dan kemampuan memfertilisasi spermatozoa. Hafez (2008b) merekomendasikan selama 30 menit dalam suhu 30°C agar antibiotik dapat bekerja didalam pengencer, kemudian diturunkan pelan-pelan hingga 5°C, sedangkan pada babi hingga pada suhu 15°C.

Prosesing semen kambing perlu beberapa kali sentrifugasi untuk mencegah terjadinya koagulasi (Corteel, 1977) kemudian didinginkan paling cepat 1 jam dari suhu 35°C hingga 5°C, prosesing pendinginan ini selalu menggunakan perlindungan air agar tidak cold shock kalau dilakukan kontak langsung antara semen dengan suhu refrigerator.

Masuda (1992) berpendapat bahwa proses pendinginan semen pada suhu 5°C sesuai prosedur meliputi: (1) penambahan pengencer A yang dilakukan pada suhu 30 °C kemudian (2) pendinginan pada suhu 5 °C dilakukan selama 1,5-2 jam (3) penambahan pengencer B yang mengandung gliserol (4) dilanjutkan proses pembekuan setelah 2-3 jam dari proses glisero-ekuilibrasi. Pendinginan semen pada suhu 5 °C sebelum

penambahan pengencer B atau pengencer yang mengandung gliserol, dapat meningkatkan daya hidup sel setelah proses pembekuan atau pencairan (*thawing*). Gliserolisasi di suhu dingin (5°C) memberikan hasil yang lebih baik.

Proses pendinginan untuk semen cair adalah semen yang telah ditampng diuji kualitasnya, bila motilitas diatas 70% dapat diproses lebih lanjut. Pengencer yang telah ditetukan (tris aminomethan kuning telur atau andromed) dimasukkan ke air hangat 37°C. Semen diencerkan sehingga konsentrasinya menjadi 100 juta/mililiter, kemudian dimasukkan ke dalam refrigerator.

Setelah suhu mencapai 5°C, semen dimasukkan ke dalam *straw* dan bisa langsung digunakan untuk IB semen cair ini dapat digunakan selama 3 hari.

7.1. Prinsip-prinsip pembekuan sel (*Cryobiologi*)

Prinsip pembekuan sel , jaringan, embrio dan sel gamet adalah prinsip biofisika. Sel atau spermatozoa akan mengalami kerusakan pada saat proses pembekuan dan *thawing*, karena terbentuknya kristal es didalam sel, pada proses pembekuan yang cepat akan memperkecil kristal es, sedangkan sistem pembekuan yang lama akan memperbesar kristal es sehingga tingkat kerusakannya lebih tinggi, Proses pembekuan yang optimal adalah agar sel toleransi terhadap efek kristal dan efek racun dari pengencer.

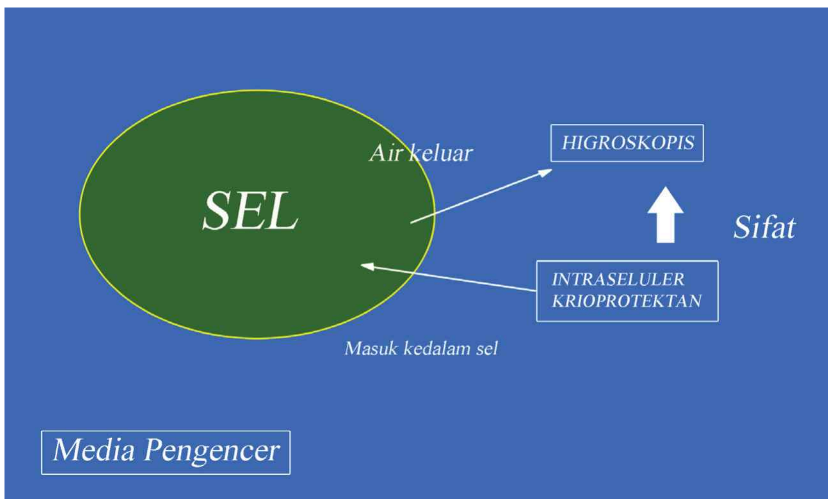
Pada saat sel disuhu 0°C bentukan es intra selluler akan terbentuk karena sebagian besar spermatozoa tersusun oleh air, dengan penambahan intra seluler krioprotektan (misal gliserol, DMSO, ethileen glicol) akan menurunkan titik beku sel sepemarozoa hingga – 196°C. Mekanisme perubahan titik beku disebabkan oleh peristiwa masuknya kripprotektan didalam sel seperti yang digambarkan oleh gambar 8.1. yaitu intraseluler krioprotektan yang bersifat higroskopis, akan menarik air yang ada didalam sel, kemudian digantikan oleh intraseluler krioprotektan. Selain dibutuhkan intraseluler krioprotektan juga dibutuhkan ekstraseluler krioprotektan yaitu dapat

berupa phospolipid atau glucose, oleh sebab itu bahan-bahan ekstraseluler krioprotektan adalah lesitin (sehingga sering dipakai kuning telur yang mengandung lesitin), ekstraseluer lainnya adalah golongan gula yaitu fruktosa, glucosa, rafinosa dll. Range temperatur kritis untuk hidupnya sel adalah -4°C menjadi -60°C saat pembekuan , sedangkan saat *thawing* antara suhu -70°C menjadi – 20°C.

Proses pendinginan, pembekuan dan *thawing* mengakibatkan stress fisik dan kimia pada membran spermatozoa yang dapat menurunkan viabilitas dan kemampuan memfertilisasi spermatozoa. Spermatozoa yang mengalami *cold shock* diakibatkan adanya stress oksidatif oleh ROS (*Reactive Oxygen Species*). Semen beku juga dilaporkan menyebabkan penurunan viabilitas spermatozoa, perubahan fungsi spermatozoa, komposisi *lipid,* dan susunan plasma membrane spermatozoa dan perubahan kelompok sulfhydryl pada membran protein.

Selama pendinginan, konsentrasi konsentrasi intra- dan extraseluler larutan terjadi perubahan sebagai hasil pembentukan es eksternal dan pengeluaran air dari dalam sel. Bermacam penelitian dilaksanakan pada system pendinginan suhu 5 °C selama 20-22 jam sebelum penambahan pengencer B dengan hasil motilitas spermatozoa jauh lebih baik dari prosedur beku dan lebih baik dari metode berikut ini yaitu semen yang disimpan setelah proses glisero-ekuilibrasi atau setelah penambahan pengencer B selama 20-22 jam (Masuda, 1992).

Gliserolisasi adalah penambahan gliserol pada pengencer berfungsi melindungi dari efek lethal selama proses pembekuan. Penambahan *cryoprotectan* gliserol dilakukan beberapa jam sebelum pembekuan agar sel spermatozoa berkesempatan untuk berekuilibrasi dengan gliserol. Gliserol dipakai sebagai zat pelindung pada proses pembekuan semen dan ditambahkan secara bertahap pada semen setelah *cooling*.



Gambar 7.1 Mekanisme masuknya krioprotektan didalam sel.

Pada proses pembekuan spermatozoa, menempatkan *straw* 8-10 cm diatas permukaan nitrogen cair dan dengan menggunakan rak dinamis menghasilkan persentase motilitas dan spermatozoa hidup nyata lebih baik. Kerusakan sel spermatozoa akan terjadi apabila dibiarkan -80°C selama lebih dari 4 detik. Setelah semen dimasukkan dalam N_2 cair maka motilitas dan viabilitas semen beku dapat dapat dievaluasi sebelum 48 jam setelah pembekuan dengan di*thawing* dalam air suhu 37°C selama 15-30 detik.

Kemampuan memfertilisasi semen beku lebih rendah dari semen segar. Hal ini disebabkan adanya kerusakan sel yang dapat menurunkan kemampuan memfertilisasi. Kerusakan tersebut umumnya terdapat pada akrosom dan mitokondria. Selama pembekuan, ada dua proses penting yaitu yang pertama adalah produksi dari ROS yang dapat merubah fungsi dan struktur membran. Kedua adalah perubahan sistem pertahanan antioksidan berdasarkan penurunan isi glutathionine intraseluler. Kerusakan membran spermatozoa banyak terjadi karena pembentukan kristal es khususnya selama titik kritis 0-10°C. Kerusakan terbesar pada plasma membran dan tudung akrosom terjadi selama pembekuan dan *thawing* yang diikuti oleh equilibrasi.

Tabel 7.1. Karakteristik biofisika dari beberapa krioprotektan

Parameter	**DMSO**	**Gliseol**	**Ethylene Glycol**
Formulasi kimia	$(CH_3)_2SO_4$	$C_3H_3(OH)_3$	$(CH_2OH)_2$
Berat molekul	78,13	92,10	62,07
Specific gravity (g/cm^3 pada 20°C)	1,10	1,25	1,11
Mass (g/L) 1,0 M 3,0 M	 78,13 234,39	 92,10 276,30	 62,07 186,21
Volume (mL/L) 0,1 M 3,0 M	 71,00 21,10	 73,70 221,10	 5,90 167,70
Sigma chemical Catalog No	 D-5879	 G-7757	 E-9129
Specivic gravity : ratio berat dengan volume dibandingkan dengan berat dan air pada 0°C			

7.1.1. Banyaknya pengenceran

Semen diencerkan dengan tujuan untuk memperbanyak volume, sehingga satu pejantan dapat dimanfaatkan oleh banyak betina dalam satu kali ejakulasi. Jumlah pengenceran untuk semen cair lebih banyak dari pada pada semen beku. Semen cair dapat diencerkan 200-300 kali dengan jumlah spermatozoa yang motil lebih rendah, yaitu 5 juta spermatozoa yang motil per IB masih mempunyai fertilitas yang tinggi.

Proses pengenceran semen sampai dengan 5°C (atau 15°C pada babi) adalah dengan cara yang sederhana hanya ditabahkan pengencer padasuhu yang sama. Semen cair pada sapi, kambing, domba dan babi, fertilitas akan menurun beberapa hari setelah dikoleksi, sehingga Hafez (2005b) merekomendasikan pada hari berikutnya.

Penambahan gliserol untuk pembekuan dengan cara menambahkan pada pengencer sesuai dengan metode

pembekuannya yaitu ditambahkan pada suhu 5°C, hal ini karena gliserol akan melindungi sebelum dibekukan. Jumlah akhir gliserol adalah 5% pada media gula-kuning telur dan 10 % untuk susu. Penambahan dilakukan pelan-pelan selama 1 jam akan tetapi bebetapa peneliti telah merekomendapasi dapat dilakukan 1 kali penambahan dalam pengencer. Proses penyesuaian atau equilibrasi yang optimal adalah 4-6 jam tergantung media yang digunakan.

Semen beku dapat di kemas dalam 3 cara yaitu :

1. *Straw Polyvenyl chloride* yang berisi 0,25 – 0,5 ml pengencer semen.
2. *Glass ampules* yang berisi 0,5 – 1 ml
3. Pelet yang berisi kira-kira 0,1 – 0,2 ml

Semakin kecil kemasan, konsentrasinya semakin tinggi sebab yang dihitung adalah total spermatozoa tiap dosis IB

7.2. Pembekuan semen sapi

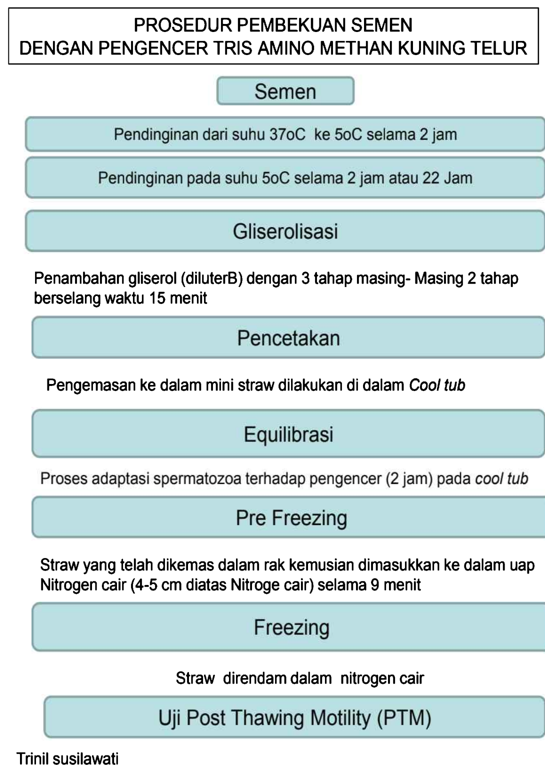
Bahan untuk pembekuan yang dapat digunakan adalah dry ice, liquid cair, O_2 cair dan N_2 cair yang paling populer sebab merupakan pilihan yang cocok karena dapat disimpan dalam waktu yang lama dengan teknik penyimpanan yang mudah dengan menggunakan kontainer (Hafez, 2008b).

Metode pembekuan dengan mengunakan pelet , *straw* atau ampul selalu didinginkan lebih dulu dalam suhu 5°C , kemudian diuapkan diatas N_2 cair sebelum di masukkan di dalam N_2 cair, Hal ini karena starw atau ampul mempunyai dinding yang kuat, sehingga memberikan kesimpatan agar dinginnya masuk terlebih dahulu dalam waktu yan cepat. Bila menggunakan ampul kira-kira 3°C per menit hingga – 15°C, biasanya titik bekunya sekitar -150°C dan ampul juga dimasukkan dalam N_2 cair dengan suhu -196°C. Pembekuan yang sangat cepat akan menyebabkan cold shock dan pembentukan kristal es, pembekuan dengan cara lambat dapat menyebabkan konsentrasi garam meningkat saat keluarnya air pada saat pembekuan dan meningkatnya tekanan osmose pada periode pembekuan aan merusak protein dan lipo protein didalam spermatozoa dan akrosom.

Hal yang sangat penting adalah selalu melakukan kontrol nitrogen cair secara periodik dengan melhat volume didalam kontainer, karena bila kurang akan mematikan spermatozoa yang telah dibekukan.

$$\text{Recovery Rate} = \frac{\text{(Motilitas semen beku)}}{\text{Motilitas sebelum pembekuan}} \times 100\%$$

Recovery rate = Penurunan motilitas pada proses pembekuan



Gambar 7.2 Prosedur pembekuan semen hasil sexing menggunakan pengencer Tris Aminomethan Kuning Telur

PROSEDUR PEMBEKUAN SEMEN
DENGAN PENGENCER ANDROMED@

Semen

Pendinginan dari suhu 37oC ke 5oC selama 2 jam

Pendinginan pada suhu 5oC selama 2 jam atau 22 Jam

Pencetakan

Pengemasan ke dalam mini straw dilakukan di dalam *Cool tub*

Equilibrasi

Proses adaptasi spermatozoa terhadap pengencer (2 jam) pada *cool tub*

Pre Freezing

Straw yang telah dikemas dalam rak kemusian dimasukkan ke dalam uap Nitrogen cair (4-5 cm diatas Nitroge cair) selama 9 menit

Freezing

Straw direndam dalam nitrogen cair

Uji Post Thawing Motility (PTM)

Trinil susilawati

Gambar 7.3 Prosedur pembekuan semen menggunakan pengencer Andromed®.







Gambar 7.4 Macam-macam Container Nitrogen Cair



Gambar 7.5 Macam-macam Canister

7.2.1. Identifikasi *Straw*

Identifikasi *straw* di BBIB Singosari dilakukan setelah gliserolisasi, semen dimasukkan kedalam *straw*, sebelum dimasukkan kedalam *straw* terlebih dahulu dilakukan identifikasi terhadap *straw*, meliputi identitas bangsa pejantan, tahun kelahiran pejantan, nomor urut pejantan dan tempat produksi. Identifikasi *straw* akan sangat membantu dalam pelaksanaan IB dilapangan oleh inseminator dan *recording* di suatu perusahaan yang menerapkan IB.

Semen diisikan dengan menggunakan *Ultrasonic Filling Sealing Machine*. Pada pengisian *straw*, setiap *straw* dipasang pada dua buah sisir khusus sedemikian rupa sehingga sisir satu mengisi, sedang sisir lainnya menyedot cairan semen kemudian ditutup dengan panas listrik secara otomatis pada ujung *straw* yang tidak ada penutup pabriknya. Volume per dosis atau per *straw* untuk semen sapi adalah 0,25 ml dengan konsentrasi *spermatozoa* 25 x 10^6. *Straw* yang sudah diisi diletakkan dalam rak untuk dilakukan perlakuan equilibrasi. Hal ini sesuai dengan pendapat Toelihere (1993) jumlah semen di dalam *straw* biasa (*midi straw*) adalah 0,5 ml dan mini *straw* 0,25 ml.

Dengan sendirinya konsentrasi *spermatozoa* harus jauh lebih tinggi supaya tetap mengandung minimal 12 juta sel untuk setiap *straw*. Penyimpanan *straw* banyak menghemat tempat, juga ringan dan praktis dibawa kemana-mana. *Straw* dapat dibuat dalam berbagai warna, setiap warna untuk identifikasi pejantan tertentu. Sedangkan menurut pendapat SNI 01-4869.2-2005 bahwa jumlah sel *spermatozoa* dalam mini *straw* 30 juta per *straw* dengan ukuran mini *straw* yang bervolume 0,25 ml.

7.2.2. Kode Warna dan Kode Nomor *Straw*

Kode-kode ini dipergunakan untuk mengenal pejantan yang menghasilkan semen yang bersangkutan secara individu. Juga dapat diketahui nomor pembuatan (*batch number*) sehingga kalau ternyata ada sejumlah besar semen dengan kode yang sama menunjukkan penilaian hasil Inseminasi yang tidak memuaskan, segera dapat diumumkan kepada daerah-daerah untuk tidak lagi mempergunakan sisa semen dengan kode dimaksud. Disamping itu BBIB Pusat atau BIB Daerah penghasil semen yang bersangkutan dapat meneliti sebab-sebab dari pada hal yang kurang memuaskan ini.

Kode-kode semen sangat vital untuk menerapkan sistim "recording" dalam pelaksanaan IB yang dilengkapi dengan "progeny testing". Kode-kode semen yang dipergunakan di lapangan hendaknya dicatat secara lengkap dalam laporan-laporan petugas dalam pencatatan dan laporan Pelaksanaan IB.

Untuk mempermudah pengenalan jenis/bangsa sapi dari kumpulan sejumlah semen beku atau *straw*, dipergunakan *straw* dengan warna yang berlainan untuk masingmasing bangsa sebagai berikut:

Tabel 7.2. Identifikasi *straw* di BBIB Singosari

No	Bangsa Pejantan	Warna *Straw*
1	Bali	Merah
2	Ongole	Biru Muda
3	Frisien Holstein	Abu-abu
4	Limousine	Merah Muda/Pink
5	Simental	Bening

No	Bangsa Pejantan	Warna *Straw*
6	Brahman	Biru Tua
7	Madura	Hijau Muda
8	Brangus	Hijau Tua
9	Angus	Kuning Orange
10	Kambing PE	Kuning

Sumber: Data primer BBIB Singosari (2011)

Sedangkan untuk identifikasi BBIB Lembang tidak jauh berbeda dengan BBIB Singosari yaitu :

Tabel. 7.3 Identifikasi *straw* di BBIB Lembang

Bangsa sapi	Warna *straw*
Bali	Merah
Madura	Hijau
Ongole	Biru muda
Frissian Holstein (FH)	Abu-abu
Brahman	Biru Tua
Angus	Salem
Brangus	Hijau tua
Simmental	Transparans
Limousin	Merah Jambu

Arti Kode Pejantan

Contoh: 3 97 39

3			: Kode menunjukkan bangsa sapi Frisien Holstein
	97		: Dua angka terakhir tahun kelahiran pejantan
		39	: Nomor urut pejantan masuk di BBIB Singosari

BIB lembang	A002
ONGOLE	
ARJUNA 2302	

Keterangan :

A 002	Adalah nomor pembuatan (batch number)
2302	Adalah nomor kode pejantan

ARJUNA	Adalah nama pejantan
ONGOLE	Adalah jenis/bangsa pejantan
BIB Lembang	Adalah Pabrik yang membuat .

7.2.3.Glycerol Equilibration Time

Kartasudjana, (2001) menyatakan glycerol digunakan sebagai *cryoprotective agent* pada proses pembekuan semen untuk pengencer *Yolk Sitrat* dan *Tris Buffered Yolk* menggunakan 7% *glycerol* sedangkan untuk pengencer susu menggunakan 10-13% *glycerol* adalah yang terbaik. Pemakaian *glycerol* oleh BBIB Singosari tidak hanya pada pengencer susu tapi juga pada pengencer *trisaminomethane.* Glycerol juga dapat mencegah terjadinya *cold shock.* Pengaruh *cold shock* ada dua macam yaitu pengaruh terhadap fisiologis dan kimia. Efek secara fisiologis misalnya ekor dan tengah badan yang melingkari kepala, hal ini perlu dihindari maka itu perlu diperhatikan dalam penambahan *glicerol.* Herliantien, (2000) menyatakan penambahan *glicerol* ini dilakukan pada saat suhu mancapai 5°C karena bila penambahannya pada temperatur ruang (suhu 35°C) maka *spermatozoa* akan mengalami kerusakan, karena itu penambahan *glycerol* ditempatkan pada *cool top* untuk menghindari suhu ruang.

Glycerol Equilibration Time merupakan proses penyesuaian dari suhu -5ºC menuju *prefreezing* -140ºC dan *freezing* -196ºC. Waktu equilibrasi selama 2 jam di BBIB Singosari didasarkan pada uji coba oleh BBIB Singosari sendiri dengan waktu equilibrasi 2, 3, 4 dan 5 jam dengan hasil tidak berbeda nyata (Herliantien, 2000).

7.2.4.*Pre Freezing* dan *Freezing*

A. Pre Freezing

Setelah didiamkan dalam *cool top* selama lebih kurang 3 jam, maka sebelum dibekukan dalam *container freezing* hendaknya diuapkan diatas nitrogen cair setinggi 5 cm selama ±10 menit hingga suhu mencapai -140°C. Dengan perlakuan ini diharapkan *spermatozoa* tidak mengalami *cold shock* karena perubahan suhu

secara mendadak. Pembekuan ini terhadap waktu kritis bagi *spermatozoa* yaitu pada saat penurunan suhu 5°C ke -15°C, waktu tersebut dikenal dengan sebutan *critical periode,* karena pada suhu ini *spermatozoa* peka terhadap *cold shock.* Oleh karena itu kualitas *spermatozoa* yang jelek salah satu tingkat kematian yang tinggi terjadi pada saat ini, misalnya pada saat pemeriksaan *Before Freezing* (BF) lolos, belum tentu pada akhir pemeriksaan PTM bisa lolos, karena bisa saja pada periode ini mengalami kematian pada *spermatozoa. Pre freezing* ini merupakan awal dari proses pembekuan.

B. Freezing

Proses pembekuan terdiri dari 2 metode yaitu pendinginan dengan suhu 5°C, yaitu metode yang susah dilakukan pada saat proses pengenceran di *cool top* dan proses pembekuan dengan nitrogen cair. Nitrogen cair dengan temperatur -196°C adalah pilihan terbaik untuk proses pembekuan semen. *Freezing* yang terlalu cepat dapat menyebabkan *thermal shock.* Freezing yang lambat menyebabkan konsentrasi garam meningkat, seperti air membeku. Peningkatan ini berpengaruh pada tekanan osmotik yang berlebihan selama periode ini, dan dapat menyebabkan kerusakan *protein, lipoprotein, dan acrosom* pada sel *spermatozoa.* Sehingga di BBIB Singosari proses *freezing* dilakukan dari proses *pre freezing* dipindahkan dengan cepat dan langsung dipindah ke *container storage,* hal ini dilakukan karena untuk menghindari pengaruh buruk tersebut yang menurunkan motilitas *spermatozoa.*

7.2.5 Penyimpanan *(storage)*

Setelah dilakukan *freezing* dengan cepat dipindahkan ke kontainer penyimpanan *straw. Straw* disimpan dalam nitrogen cair bisa bertahan sampai lebih 20 tahun dengan setiap 6 bulan sekali ditambahkan nitrogen cair secara kontinyu. Suatu tangki yang dimanfaatkan untuk keperluan di lapangan mampu menyimpan 600-1200 *straw* plastik berisi semen terproses yang telah diencer. Container penyimpanan ini diisi kembali dengan nitrogen cair tiap 60-90 hari maka cara simpan ini dapat mengawetkan semen untuk jangka waktu yang tak terbatas. Sehingga pada kondisi

lapang, *straw* dapat digunakan pada beberapa tahun kemudian tetapi pengaturan nitrogen cair harus diperhatikan agar tidak sampai kehabisan.

Penanganan *(Handling)* Semen Beku

Semen yang dihasilkan oleh B/BIB Nasional, BIBD atau semen ex impor sudah diuji kualitasnya (motilitas). Kualitas tersebut akan sangat dipengaruhi oleh penanganan dalam penyimpanan dan perlakuan lainnya sewaktu dalam perjalanan antara BIB, SP-IB, Pos IB hingga saat diinseminasikan.

Cara penyimpanan dan pemindahan semen telah diajarkan kepada peserta kursus/latihan Handling Semen. Namun demikian ada kemungkinan tugas penyimpanan dan pemindahan semen dari satu wadah (*container*) ke wadah lainnya di daerah tepaksa dipercayakan kepada petugas bukan Inseminator. Hal-hal pokok yang harus diketahui ialah:

1. *Straw* (semen beku) yang disimpan dalam *container* (wadah penyimpanan) ditempatkan dalam *goblet* yang alas/dasarnya tertutup rapih, goblet-goblet ditempatkan dalam *canister* yang alas/dasarnya tertutup atau berlubang-lubang. Apabila semen langsung ditempatkan dalam canister (tanpa goblet), maka harus dipergunakan canister dengan alas tertutup.
2. *Canister* (1 s/d 6 buah) ditempatkan dalam container yang berisi Nitrogen Cair (N2). N2 cair tidak boleh sampai habis menguap oleh karena hal ini akan menyebabkan semua benih yang tersimpan di dalamnya akan mati. Dianjurkan permukaan N2 cair dalam container selalu dijaga agar seluruh *Straw* terendam dalam N2 cair.
3. Pemindahan Semen dari satu *container* ke *container* lainnya dilakukan sebagai berikut:
    - Container dimana *Straw* akan dipindahkan diisi terlebih dahulu dengan N2 cair dimana canister dan goblet kosong sudah berada di dalamnya.
    - Tempatkan kedua container sedekat mungkin.
    - Angkat canister sampai ke mulut container dan jepit tangkainya dengan penjepit (*forcep*).

- Pindahkan *Straw* secepat mungkin dari canister A ke canister B dengan memakai pinset atau dengan jari yang bersarung tangan. Waktu yang dipergunakan untuk pemindahan *Straw* dari canister A ke canister B tidak boleh lebih dari 3 detik.
- Penempatan container sebaiknya pada ruangan khusus yang memiliki sirkulasi udara dan penerangan yang cukup (Pedoman Optimalisasi IB tahun 2012)

Pengaturan Penyediaan Semen Beku dan Nitrogen Cair

Patokan yang harus diperhatikan ialah:

1. Jangan sampai terjadi seekor sapi betina yang memerlukan pelayanan Inseminasi tidak dapat diinseminasi oleh karena semen beku atau jenis yang diperlukan telah habis.
2. Harus diperhatikan agar *container* selalu terisi nitrogen cair yang merendam semen beku yang tersimpan di dalamnya.
3. Nitrogen cair untuk keperluan transportasi temasuk untuk operasional Inseminasi di lapangan harus selalu tersedia.

Untuk keperluan tersebut diatas harus dapat diperhitungkan dengan tepat jumlah dosis kebutuhan semen beku dari masing-masing bangsa sapi dan kebutuhan nitrogen cair untuk satu periode tertentu.

Untuk mempermudah pengaturan distribusi, jumlah kebutuhan tersebut sebaiknya diperhitungkan setiap 6 bulan untuk dosis semen beku dan kebutuhan semen beku sudah harus terperinci untuk masing-masing bangsa sapi.

Angka-angka kebutuhan semen beku dikirimkan kepada BIB Pusat atau BIB Daerah yang melaksanakan distribusi semen beku.

7.2.6. *Straw* Printing & Sterilisasi *Straw*

A. *Straw* Printing

a. Pengecekan bangsa pejantan dengan warna *straw*
   - Holstein : Abu – abu
   - Limousin : Pink
   - Simental : Putih Transparan

- Brahman : Biru Tua
- Ongole : Biru Muda
- Angus : Oranye
- Brangus : Hijau tua
- Bali : Merah
- Madura : Hijau Muda

b. Mengatur posisi label bangsa pejantan , nama pejantan, kode pejantan, kode *batch*, tempat produksi (BIB Singosari) yang akan dicetakkan
c. Menyiapkan jumlah *straw* yang akan dicetak
d. Mengecek hasil printing

B. Sterilisasi Straw

a. Masukkan *straw* yang sudah dicetak ke dalam alat sterilisasi ultra violet untuk *straw* . Lakukan sterilisasi selama 15 menit
b. Posisi *straw* harus diatur agar seluruh bagian dari *straw* terkena sinar ultra violet
c. Straw yang sudah disterilisasi siap untuk digunakan

C. Filing & Sealing Straw

a. Bersihakan lemari dan mesin filling & Sealing
b. Dinginkan seluruh peralatan yang akan digunakan untuk *filling & sealing* pada suhu 4 -5 C sebelum digunakan
c. Mengecek label nama dan kode pejantan yang terdapat pada tabung berisi semen yang akan diisikan dengan nama yang tercantum pada *straw*
d. Menganti silicon tube dan tipper disk (*filing straw* dan *flexible rubber*) setiap kali filling & sealing / pengisian semen
e. Mengecek hasil filling & sealing
f. Membersihkan alat dan lemari filling & sealing lalu didesinfeksi dengan kapas beralkohol 70%

D Menyusun *Straw* Di Rak *Straw*

a. Dinginkan rak *straw* , *straw* plate dan alat –alat lain
b. Gunakan sarung tangan kain untuk memegang *straw* (jika dipegan langsung bisa menimbulkan *temperature shock*)
c. Menyusun *straw* di rak *straw* (rak besar berisi 175 batang

dan rak kecil 100 batang)

d. Jangan mencampur *straw* yang berbeda pejantan dan bangsa
e. Mengecek *straw* yang tidak bagus atau *straw* yang rusak
f. Meghitung jumlah *straw* yang siap diproduksi

E. Pre – Freezing

a. Ketinggian N2 Cair kurang lebih 2 cm dibawah saringan container processing
b Copperplate sebanyak 4 buah dimasukkan kedalam container dengan posisi vertical disudut jaringan, dan akan menimbulkan luapan gas N2 Cair
c. Setelah luapan N2 cair surut,penurunan suhu dikontrol dengan menggunakan thermo control hingga suhu mencapai – 150
d. Pada saat suhu telah mencapai – 150 C masukkan *straw* yang sudah ada di rak dengan posisi horizontal/tidur satu tingkat , selanjutnya masukkan 2 copper plate lagi secara pelan – pelan agar N2 cair tidak meluap dan tutup container dengan penutupnya
e. Tunggu selama 9 menit
f. Proses Pre-Freezing selesai dan dilanjutkan dengan proses freezing

F. Freezing Dan Penyimpanan Straw Tiap Pejantan

a. Dinginkan canister di dalam container yang berisi N2 cair
b. Mengecek nama dan code pejantan ditiap rak sebelum dimasukkan ke canister
c. Gunakan sarung tangan kain (untuk melindungi tangan dan menghindari temperature shock pada *straw*)
d. Lakukan pengecekan *straw* didalam container yang telah diisi nitrogen air (untuk mencegah naiknya suhu *straw*)
e. Memindahkan canister dari container penyimpanan
f. Mencacat data tentang isi setiap container

G. Pemeriksaan Setelah Thawing

a. Setelah *freezing* , siapkan sampel semen untuk segera diperiksa (pada hari pembekuan atau keesokkan harinya)
b. Siapkan air hangat dengan suhu 37-38 C di tempat *thawing*

(seluruh bagian *straw* terndam)

c. Siapkan mikroskop , hangatkan semen *examination plate* atau *object glass,cover glass,*gunting *straw,*ose,kertas tissue,kapas berakhlol 70% dan kain kasa
d. Rendam *straw* selama 7 detik dengan posisi sumbat pabrik dibagian bawah atau dalam posisi horizontal sehingga seluruh bagian *straw* terendam
e. Angkat *straw* dan keringkan sisa air yang menempel di *straw* dengan air kasa steril atau kertas tissue
f. Potong *straw* menggunakan gunting *straw* yang sudah disucihama (desinfeksi)
g. Teteskan sampel pada semen examination plate atau object glass lalu tutup dengan cover glass
h. Lakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 200 atau 400 kali
i. Pemeriksaan setelah *thawing* yang memenuhi syarat
j. Presentase spermatozoa yang motil,minimal 40% ++ - ++
    - Jumlah spermatozoa motil,minimal 12.000.000/*straw*
    - Presentase spermatozoa yang abnormal , maksimal 10%
k. Apabila hasil pemeriksaan sampel tidak bagus,maka ambil satu *straw* baru untuk diperiksa (pengujian maksimum dilakukan pada 3 *straw*)
l. Catat data hasil pemeriksaan
m. Hasil pemeriksaan yang tidak bagus harus dicari dan dibahas mengenai penyebabnya (khususnya jika motilitas dan konsentrasi spermatozoa yang tidak bagus, ada nanah dalam semen, dll)

H. Penyimpanan di Container Besar

a. Simpan *straw* di container besar , pisahkan container yang berisi *straw*/ semen beku bagus dengan yang tidak bagus (buat peta penyimpanan *straw* pada container)
b. Memeriksa volume N2 cair di dalam container bila hanya ada satu lapis goblet.minimal 1/3 bagian dari volume total atau tinggi container
c. Memeriksa kembali container yang tidak normal (dengan

memeriksa apakah didaerah mulut container terdapat embun atau bunga es

I. Distribusi

a. Memeriksa lagi nama dan bangsa pejantan pada *straw* yang akan dikirim
b. Lakukan pemeriksaan setelah *thawing* sekali lagi sebelum dilakukan pengiriman atau pendisstribusian , dengan nilai PTM minimal 40 % ++ - +++
c. Menghitung jumlah *straw* yang akan dikirim dengan cara menyusun *straw* diatas rak
d. Masukkan *straw* kedalam container
e. Memeriksa kembali N2 Cair didalam container (Tambahkan jika kurang)
f. Catat lagi data –data : Nama dan bangsa pejantan , kode *batch* , dosis , motillitas , dan tempat produksi (BIB Singosari)

BAB VIII
Thawing dan Teknik Inseminasi Buatan

8.1. Mekanisme dan beberapa Teknik Thawing

Thawing yang sering dilakukan di BIB dikerjakan pada suhu 37-38ºC selama 15-30 detik. Pemeriksaan pengaruh pembekuan terhadap motilitas spermatozoa di BIB sebagai *Quality Control* dilakukan secara rutin yaitu setiap bulan, 6 bulan, setiap tahun dan setiap semen yang akan didistribusikan. *Post Thawing Motility* (PTM) merupakan pemeriksaan setelah pencairan kembali (*thawing*) . sebelum dilakukan pengiriman atau pendistribusian, dengan nilai PTM minimal 40% ++ ~ +++. Atau dilakukan sebelum dilakukan Inseminasi Buatan.

Toelihere, (1993) menyatakan semen beku yang hendak dipakai, dikeluarkan dari *container* dan dicairkan kembali supaya dapat disemprotkan kedalam saluran betina. Sesudah *Thawing* semen beku merupakan barang rapuh dan tidak dapat tahan lama hidupnya seperti semen cair. Semen beku yang sudah dicairkan tidak dapat dibekukan lagi.

Thawing semen dilakukan pada suhu 37ºC selama 30 detik, sedangkan Partodihardjo (1987) menambahkan bahwa *thawing* dilakukan dengan mencelupkan *straw* ke dalam air bersuhu 25-27ºC selama 30 detik. Hal ini sesuai dengan SNI 01-4869.2-2005 *post thawing* dilakukan pada suhu 37-38ºC selama 15-30 detik.

Standar Operasional Prosedur *Post Thawing Motility* yang dilakukan oleh BIB adalah sebagai berikut:

1. *Straw* direndam ke dalam *beaker glass* yang berisi air hangat dengan suhu 37-38ºC selama 15-30 detik dengan posisi sumbat pabrik dibagian bawah.

2. *Straw* diangkat dan dikeringkan dengan tisu.
3. *Straw* dipotong dengan menggunakan gunting pada salah satu ujungnya dan sedikit bagian tengahnya.
4. Selanjutnya semen diteteskan ke dalam gelas obyek yang telah dibersihkan dengan alcohol 70%, kemudian ditutup dengan *cover glass.*
5. *Obyek glass* dipasang pada *slide warmer* yang telah dipasang pada mikroskop dengan suhu 37-38ºC agar gerak *spermatozoa* menjadi maksimal. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 200-400X.

Straw yang telah berisi semen beku dapat di *thawing* dengan menggunakan air dengan suhu 37°C selama 45 detik dan dijaga dari suhu dingin, akan tetapi dapat juga *thawing* dilakukan dengan air dengan suhu lingkungan atau air es dengan waktu yang lebih lama, hal ini disesuaikan dengan kondisi lingkungan. Proses *thawing* ini dampaknya sama besarnya dengan proses pembekuan, jadi apabila terdapat kesalahan didalam *thawing* maka kualitas semen akan turun, oleh sebab itu peningkatan suhu hendaknya dilakukan secara pelan-pelan.

8.2.Teknik Inseminasi Buatan

Teknik atau metode Inseminasi Buatan ada 2 macam yaitu Rektovaginal dan transservikal. Pada sapi adalah dengan metode rektovaginal yaitu tangan dimasukkan kedalam rektum kemudian memegang bagian servik yang paling mudah diidentifikasi karena mempunyai anatomi keras, kemudian insemination gun dimasukkan melalui vulva, ke vagina hingga ke bagian servik. Sedangkan pada Babi, kambing dan domba adalah dengan metode transervikal. Pada kambing dan domba dapat menggunakan spikulum untuk melihat posisi servik ,kemudian insemination gun dimasukkan hingga mencapai servik, sedangkan pada babi menggunakan cattether dan dimasukkan hingga kedalam uterus.

Tabel 8.1. Deteksi berahi dan prosedur Inseminasi Buatan (ax *et al*, 2008)

Deteksi berahi	**Prosedur Inseminasi Buatan**
SAPI	
Deteksi berahi dilakukan tiap pagi dan sore, apabila tetap berdiri saat dinaiki berarti berahi	Sapi yang akan di IB sebaiknya diletakkan dikandang jepit atau diikat dan diupayakan tidak stress, semen di deposisikan di bagian uterus
DOMBA	
Berahi sulit dideteksi, sehingga deteksi menggunakan pejantan yang di vasektomi yang dilengkai dengan harness crayon	Domba betina diangkat bagian belakang, kemudian di IB pada posisi vagina/servik, selain itu juga dapat dengan metode laparoskopi.
BABI	
Babi yang lagi berahi dapat diamati menggunakan pejantan yang di vasektomi. Betina yang sedang berahi apabila ditekan pada bagian punggungnya akan tetap diam berdiri. Induk akan berahi setelah 3-8 hari menyapih anaknya, oleh sebab itu waktu menyapih anak biasanya digunakan untuk sinkronisasi berahi	Babi betina berahi ditekan bagian punggung belakangnya, kemudian tabung yang telah berisi semen dimasukkan sampai ke servik, disarankan volume banyak dan konsentrasinya tinggi
KUDA	
Deteksi berahi menggunakan teaser (jantan yang di vasektomi), ditandai dengan mengangkat ekornya saat di dekati pajantan, tetap berdisi dan beberapa kali kencing dan kontraksi pada bagian vulvanya	Daerah vulva dibersihkan sebelum di IB, untuk meminimalisasi kontaminasi, tangan dimasukkan menggunakan glove yang telah diberi pelicin dan kateter dimasukkan hingga ke servik, semen dideposisikan di bagian uterus.

8.2.1 Teknik Inseminasi Buatan pada Kambing

Peralatan-peralatan yang digunakan dalam Inseminasi Buatan pada Kambing seperti pada gambar 8.1


Container Nitrogen Cair


Insemination Gun





Gambar 8.1 Berbagai alat yang digunakan untuk IB pada kambing

Tahapan-tahapan untuk Inseminasi Buatan pada kambing

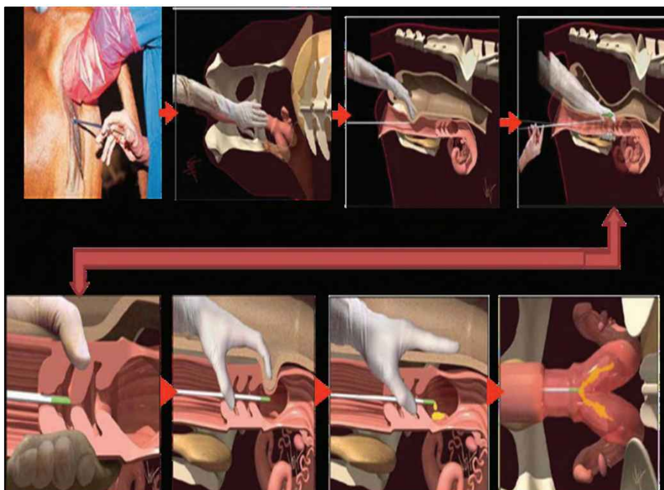
1. Persiapkan Semua Peralatan Untuk Inseminasi Buatan
2. Ikat dengan kuat kambing yang sedang estrus
3. Ambil *straw* yang berisi semen beku dari Container Nitrogen Cair.
4. Masukkan *straw* kedalam air kran selama 10 detik
5. Ambil dan bersihkan dengan menggunakan tissue
6. Masukkan ke dalam Insemination Gun
7. Potong Bagian Ujung penutup
8. Masukkan plastik Sheet ke dalam Insemination Gun
9. Angkat kambing sehingga Inseminator Mudah untuk lakukan Inseminasi Buatan.
10. Masukkan spikulum ke dalam vulva dan buka bagian vaginanya dan cari posisi serviknya.
11. Masukkan Insemination gun yang telah dipasang *straw*, ke dalam vagina sampai masuk ke dalam servik.
12. Keluarkan semen pada posisi servik
13. Tarik Insemination Gun

Keberhasilan IB pada kambing lebih rendah dari pada pada sapi karena terdapat beberapa kesulitan yaitu:

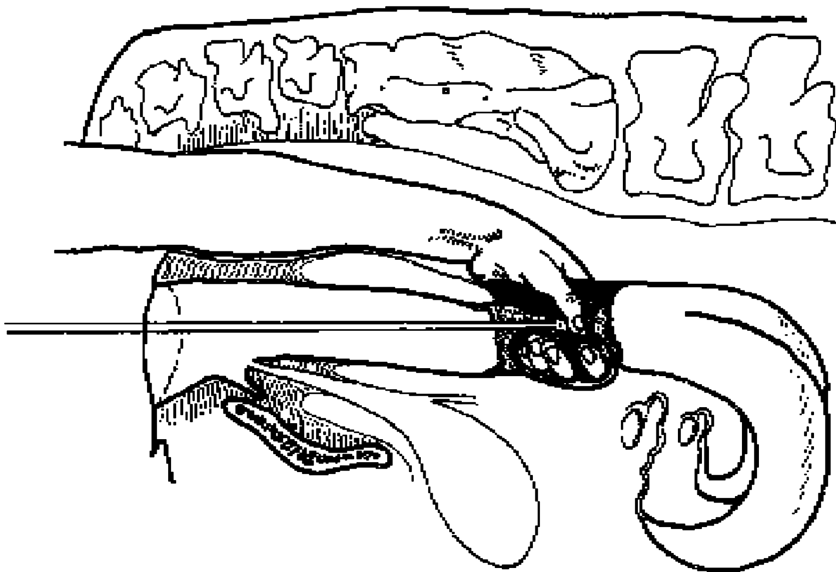
1. Tanda-tanda berahi pada kambing sulit diamati karena tidak mengeluarkan suara gaduh, sehingga deteksi berahi untuk kambing yang paling tepat adalah dengan menggunakan pengusik pejantan.
2. Teknik IB menggunakan transervikal, sehingga menggunakan spikulum, pada kambing lokal umumnya menggunakan spikulum manusia sehingga kesulitan menemukan bagian servik, sehingga dibutuhkan spikulum yang dapat mencapai servik.



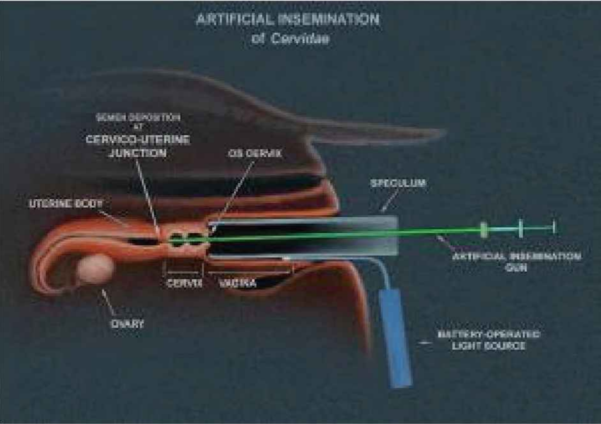
Gambar 8.2 Tahapan IB pada kambing



Gambar 8.3 Posisi Deposisi semen pada Babi



Gambar 8.4 Posisi Penempatan *Insemination gun* saat inseminasi buatan



Gambar 8.5 Posisi IB pada kambing

BAB IX
Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan Inseminasi Buatan

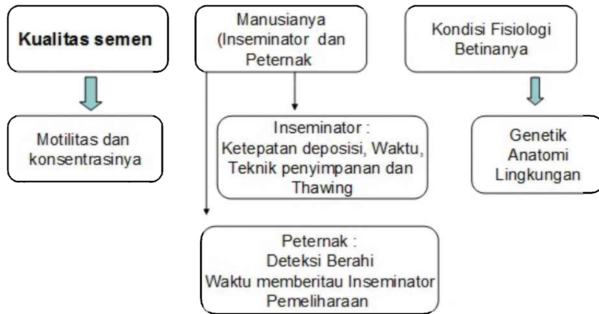
Inseminasi Buatan (IB) pada sapi merupakan yang pertama kali berkembang dan hingga saat ini banyak di aplikasikan pada masyarakat dan terbukti dapat meningkatkan produktifitas sapi, Selain pada sapi IB juga telah dilaksanakan pada beberapa ternak yang lain yaitu kuda, kambing, babi dan berbagai jenis unggas.

Keberhasilan Inseminasi Buatan di pengaruhi oleh beberapa hal yaitu (1) Kualitas semennya (2) Manusianya (Inseminator dan peternaknya) dalah hal ketepatan waktu IB dan penempatan semen (deposisi semen) (3) Fisiologi betinanya.

9.1. Kualitas semen

Parameter kualitas semen yang terpenting adalah konsentrasi dan motilitas progressifnya atau total spermatozoa yang bergerak kedepan karena hanya spermatozoa yang progressif saja yang mampu untuk melakukan fertilisasi.

Petugas dinas peternakan tingkat propinsi hingga di peternak termasuk inseminator diwajib kan mempunyai keterampilan didalam uji kualitas semen, terutama didalam menentukan motilitasnya, hal ini karena yang didistribusikan adalah semen yang mempu memfertilisasi, sehingga disetiap tahapan penyerahan semen beku harus dilakukan uji kualitas semen. Quality control dengan uji kualitas semen perlu dilakukan secara periodik seiring dengan cek volume nitrogen cair, sebab satu kali saja volume nitrogen cair sampai di posisi setelah berdirinya *straw* saja dapat berakibat kematian spermatozoa.



Gambar 9.1 Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan IB



Gambar 9.2 Peralatan penyimpanan semen beku dalam Nitrogen Cair

Kualitas semen harus tetap terjaga, oleh sebab itu semen beku harus selalu terendam didalam nitrogen cair, sekali saja tidak terendam maka spermatozoa beku tidak dapat hidup setelah di *thawing*. Dalam kondisi tersebut maka volume nitrogen cair perlu di kontrol agar semen beku tetap terendam. Apabila disuatu daerah tidak dapat secara kontinyu tersedia nitrogen cair maka sebaiknya tidak menggunakan semen beku untuk

Inseminasi Buatan, tetapi kawin alam dengan menggunakan pejantan unggul atau menggunakan semen cair.

9.1.1. Pengaruh pakan terhadap reproduksi

Pakan berpengaruh terhadap semua aktivitas hidup ternak, mulai dari metabolisme tubuh, pertumbuhan, laktasi dan juga terhadap aktivitas reproduksi, oleh sebab itu masalah pakan besar peranannya didalam efisiensi reproduksi. Pakan ternak mengandung protein, karbohidrat, vitamin dan mineral Defisiensi bahan makanan tertentu dapat menyebabkan permasalah reproduksi yang berkesinambungan, terutama pada anak-anak hingga pubertas, misalnya terjadi kekurangan bahan maka akan mengalami kerusakan secara permanen, sehingga tidak dapat bereproduksi.

Kegagalan reproduksi disebabkan oleh :

1. Defisiensi beberapa bahan makanan
2. Infeksi mikroorganisme

Sehinggga abila terdapat ketidak tepatan pemberian pakan akan berpengaruh bada abnormalitas reproduksi. Seperti:

1. Kelebihan energi dalam pakan : akan menyebabkan konsepsi rendah, *distocya, retained placentae*, dan penurunan libido.
2. Defisienfi energi dalam pakan: akan mengakibatkan terlambat pubertas, menekan estrus dan ovulasi, menekan libido dan produksi spermatozoa.
3. Defisiensi protein akan menekan estrus, rendahnya konsepsi, fetal reasorsi dan prematur.
4. Defisiensi vitamin A akan menyebabkan kegagalan spermatogenesis, an estrus panjang, konsepsi rendah, abortus, kematian saat lahir dan retained plasenta (plasenta tidak bisa keluar)
5. Defisiensi vitamin D menyebabkan pertumbuhan tulang terlambat
6. Defisiensi calsium menyebabkan cacat pada tulang dan mati saat muda.
7. Defisiensi phosphore menyebabkan an estrus dan estrus tidak normal.

8. Defiseinsi Iodine dapat menyebabkan gagal tumbuh, estrus tidak teratur, retained placenta.
9. Defisiensi Selenium dapat menyebabkan retained placenta

Pada fase-fase tententu merupakan waktu yang penting untuk pemenuhan nutrisi yaitu

1. Saat setelah sapih, bila kekurangan makanan akan dapat bersifat permanen.
2. Apabila sebelum dikawinkan ternak betina diberi pakan yang banyak mengandung energi dan protein , maka jumlah anaknya akan lebih dari satu.
3. Apabila menjelang partus/beranakan diberi makanan yang tinggi energi dan proteinnya maka produksi susunya akan meningkat dan infolusi uteri semakin cepat.
4. Apabila pakannya cukup energi dan protein saat bunting, maka embrionya akan berkembang normal.

BAB X
Rekording dan Evaluasi Keberhasilan Inseminasi Buatan

Jumlah perkawinan perkebuntingan (S/C) merupakan suatu ukuran untuk mengetahui berapa kali sapi betina dikawinkan sampai bunting. Nilai normal berkisar antara 1,6 sampai 2,0. Semakin rendah nilai tersebut menunjukkan tingkat kesuburan sapi semakin tinggi. Besarnya nilai jumlah perkawinan perkebuntingan dipengaruhi oleh kualitas semen yang rendah selain kurang trampilnya petugas inseminator di lapang (Toelihere, 1981[a]).

Diagnosa kebuntingan pada sapi dapat dilakukan dengan mengetahui ukuran *Non-Return Rate* (NRR), palpasi rektal dan *Conseption Rate* (CR) (Toelihere, 1985).

Non Return Rate (NRR) yaitu persentase jumlah ternak yang tidak kembali estrus antara hari ke-60 sampai hari ke-90 setelah dikawinkan. Nilai-nilai ini disebut juga nilai NRR pada 28 sampai 35 hari atau nilai NRR pada 60 sampai 90 hari. *Non return rate* merupakan kriteria umum yang digunakan secara luas untuk menentukan kebuntingan. Meskipun demikian terdapat beberapa kelemahan-kelemahannya yaitu tidak semua ternak dapat diamati secara cermat sehingga tidak semua ternak yang kembali berahi diketahui. Ada juga kejadian dimana ternak bunting dapat menunjukkan berahi dan sapi tidak bunting atau mengalami abortus menunjukkan *anestrus* (Lindsay *et al.*1982).

Palpasi rektal merupakan suatu cara untuk mendiagnosa kebuntingan. Indikasi ternak bunting dapat diketahui melalui palpasi per rektal terhadap cornua uteri dimana cornua uteri yang membesar berisi cairan plasenta (amnion dan allantois), palpasi

per rektal cornua uteri terhadap kantong amnion, perabaan dan pemantulan kembali fetus di dalam uterus yang membesar yang berisi selaput fetus dan cairan plasenta dan melalui perabaan plasenta. Untuk mengurangi risiko yang mungkin timbul dalam melakukan palpasi rectal baik pemeriksa maupun ternak maka diperlukan kandang jepit dan sarung tangan yang menutupi lengan untuk menjaga kebersihan. Palpasi pada 35–40 hari kebuntingan lebih membutuhkan kemahiran dari pada fase berikutnya. Namun demikian bila ketepatan hasil bisa diperoleh pada fase ini, maka akan memberikan nilai ekonomis yang lebih tinggi.

Conception Rate (CR) yaitu persentase sapi betina yang bunting pada inseminasi pertama yang disebut juga sebagai angka konsepsi. Angka konsepsi ditentukan berdasarkan hasil diagnosa kebuntingan dalam waktu 40–60 hari sesudah inseminasi (Toelihere, 1981[b]).

Kadar progesteron dapat digunakan sebagai cara untuk mendeteksi kebuntingan. Sapi yang bunting korpus luteumnya akan tetap persisten selama bunting sehingga kadar hormon progesterone dalam darah tetap tinggi. Sedangkan pada hewan yang tidak bunting kadar progesteron akan turun akibat regresi korpus luteum pada hari ke 18–24 setelah berahi. Kadar progresteron lebih dari 11 ng/ml menandakan adanya kebuntingan.

Bahan Bacaan

Ax RL, MR Dally,BA Didion, RW Lenz, CC Love, DD Varner, B. Hafez and ME Bellin. 2008. *Artificial Insemination in Farm Animal Reproduction 7th ed* by Hafez and Hafez Lea and Febiger. Philadelphia : 376 394

Bamba K. 1988. *Evaluation of Acrosomal Integrity of Boar Spermatozoa by Bright Field Microscopy Using Eosin – Negrosin Stain.* Theriogenology. June 1998, 29(6) : 1245-1252.

Bearden JH, Fuquay JW, 1984. *Applied Animal Reproduction 2nd edition* Reston Publishing Company inc. A Prentice Halls Company Virginia:341-345

Cabrita E., Alvarez R., Anel E and MP Haerriez. 1999. *The Hipoosmose Swelling Test Performed with Counter: A Method to Assay Functional Integrity of Sperm Membrane in Rainbow Trout*. Anim Reprod Sci 55: 279-287

Correa JR and PM Zavos.1994. *The Hypoosmotic Swelling Test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane.* Theriogenology.42:351-360

Corteel JM. 1977. *Production , Storage and Insemination of Goat Semen. Proceedings of the Symposium on Management of Reproduction in Sheep and Goats*. Am. Soc Anim Sci, 1977, 41-57

Fraser, LR, Ebeydeera LR, dan Niwa K. 1995. *Ca ++ Regulating Mechanism That Modulate Bull Sperm Capacitation and Acrosomal Exocytosis as Determined By Chlortetracycline Analysis*. Mol-Reprod Dev. 40: 233-241.

Garner DL dan Hafez ESE. 2008. *Spermatozoa and Seminal Plasma in Reproduction in Farm Animals 7th edition*. Ed by Hafez ESE, Lea and Febiger. Phladelphia: 96-110

Hafez, ESE. 2005b. *Preservation and Cryopreservation Gamet and Embryos in Reproduction Farm Animal*. Ed by ESE Hfez 7th Edition Blackwell Publishing 431-442.

Hafez, ESE. 2008b *Preservation and Cryopreservation of Gamet and Embryos in Reproduction Farm Animal ed by ESE Hafez 7th edition*. Blackwell Publishing: 431-442

Herliantien. 2000. *Petunjuk Penampungan, Produksi, Distribusi dan Evaluasi Semen Beku di BBIB Singosari*. Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari. Malang.

Jeyendran R.S, Van der van, H.H and M. Perz-Pelaez. 1984. *Developmen of an Assay to Acces the Fungtional Integrity of the Human Sperm Membrane and it's Relationship to Other Semen Characteristics*. J. Reprod.Fert, 70:219-228.

Lenchniak D, Kedziesski A, and D Stainislawski. 2002. *The of HOS Test to Evaluate Membrane Functionality of Boar Sperm Capacitated in vitro*. Reprod domest. Animal 37 (6): 379-380

Lindsay DR, KW Entwistle and A Winantea, 1982. *Reproduction in Domestic Livestock in Indonesia*. Australia University. Queensland

Masuda H. 1992. *Artificial Insemination Manual For Cattle*. Association of Livestock Technology Japan.

Nishikima A, Yamada M, Minami N. Utsumi K. 1997. *Evaluation of Acrosomal Status of Bovine Spermatozoa Using Concanavalin A lectin*. Theriogeology. 48 : 1007-1016.

Partodihardjo, S. 1987. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Mutiara Sumber Widya. Jakarta.

Rahmawati. 2010. *Metode Pencucian dan Pengenceran Semen untuk Mempertahankan Kualitas dan Integritas Membrane*

Spermatozoa Babi. Disertasi, Program Doktor Pertania Universitas Brawijaya.

Roca J, Hernandez M, Carvajal G, Vazquez JM and EA Martinez. 2006. *Factors Influencing Boar Sperm Cyosurvival*. J. Anim. Sci. 84:2692-2694.

Sudono, A., FR. Rosdiana., dan B.S. Setiawan. 2003. *Beternak Sapi Perah Secara Intensif*. Agromedia Pustaka. Jakarta.

Susilawati, T. 2000. *Analisis Membran Spermatozoa Sapi Hasil Filtrasi Sephadex dan Sentrifugasi Gradient Densitas Percoll Pada Proses Seleksi Jenis Kelamin*. Disertasi pasca sarjana Unair Surabaya.

Toelihere, M.R 1981. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Penerbit Angkasa, Bandung.

Toliehere, M.R.1985. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Penerbit Angkasa, Bandung.

Toelihere, 1985. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Penerbit Angkasa. Bandung.

Toelihere MR, 1993. *Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Penerbit Angkasa. Bandung.

Zenichiro K, Herliantien dan Sarastina. 2002. *Instruksi Praktis Teknologi Prosesing Semen Beku pada Sapi*. Jica – Balai Inseminasi Buatan Singosari. Malang

Biografi Penulis



Nama lengkap penulis adalah Profesor. Dr. Ir. Trinil Susilawati, MS. yang dilahirkan di Malang pada tanggal 12 November 1962 , berkerja sebagai Dosen Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang mulai tahun 1987–sekarang, dengan jabatan sekarang sebagai ketua laboratorium Reproduksi Ternak dan telah berkeluarga dengan bersuamikan Ir. Subagio dan 3 anak yaitu Mayang Adelia Puspita, SP.,MP.; Ika Rahmawati, ST.; dan Zulfikar Subagio.

Pengalaman pendidikan adalah SD Muhammadiyah 10 Malang, SMP N Malang, SMP N III Malang, S1 Fakultas Peternakan, S2- Ilmu Kesehatan Reproduksi Universitas Airlangga dan S3- Kedokteran Universitas Airlangga, selain itu terdapat pendidikan non degree di dalam dan luar negeri.

Buku yang telah diterbitkan oleh UB Press sebelumnya adalah : *Agribisnis Kambing*, *Spermatologi*, dan *Haji dan Umroh yang Nikmat*. Sedangkan yang sedang proses adalah *Sexing Spermatozoa* dan *Metodologi Penelitian dalam Biologis*